

Aus dem Institut für Physiologische Chemie,
II. Ordinariat, der Johannes Gutenberg-
Universität Mainz (Prof. Dr. K. H. Bäßler)

Die mikroanalytische Bestimmung der lang-
kettigen, aliphatischen Monocarbonsäuren
im Serum

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt

von

Dr. rer. nat. Adolf Grünert

aus

Neuleiningen

Mainz 1973

1974
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554426_0063

Aus dem Institut für Physiologische Chemie,
II. Ordinariat, der Johannes Gutenberg-
Universität Mainz (Prof. Dr. K. H. Bäßler)

Die mikroanalytische Bestimmung der lang-
kettigen, aliphatischen Monocarbonsäuren
im Serum

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt

von

Dr. rer. nat. Adolf Grünert

aus

Neuleiningen

Mainz 1973



Fachbereichsdekan: Prof. Dr. med. O. Harth
Referent: Prof. Dr. med. K. H. Bähler
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. G. Tölg
Korreferent: Prof. Dr. med. K. J. Netter

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Oktober 1974

1.	Einleitung und Problemstellung	1
1.1.	Allgemeine Bemerkungen zur Entwicklung der Fettstoffwechselforschung	1
1.2.	Zentrale Stellung der freien Fettsäuren als Energieträger zwischen dem Fettgewebe und den energieverbrauchenden Organen	3
1.3.	Kontrollmechanismen des Metabolismus des Fettgewebes	9
1.4.	Bemerkungen über den Zusammenhang zwischen Fettstoffwechsel und Kohlenhydratstoffwechsel	15
2.	Die analytische Chemie der freien Fettsäuren	18
2.1.	Makrochemische Bestimmungsmethoden	18
2.2.	Mikrobestimmungsmethoden	19
2.2.1.	Gravimetrie	20
2.2.2.	Acidimetrische Verfahren	20
2.2.3.	Photometrische Verfahren	24
2.2.4.	Gas-Flüssig-Chromatographie	25
3.	Besondere Probleme der Mikroanalytik im Hinblick auf die Untersuchung biologischer Systeme	26
3.1.	Probennahme	26
3.2.	Handhabung kleiner Volumina	30
3.3.	Trennverfahren	33
4.	Untersuchungen zu den photometrischen Bestimmungsverfahren niedriger Konzentrationen freier Fettsäuren	35
4.1.	Die Abtrennung der Metallsalze	35
4.2.	Untersuchungen zur Löslichkeit der Kupfersalze im organischen Lösungsmittelsystem	36
4.2.1.	Das atomabsorptionsspektroskopische Meßverfahren	36
4.2.1.1.	Versuche mit fettsäurenfreien Lösungen	37
4.2.1.2.	Versuche mit fettsäurehaltigen Lösungen	38
4.3.	Farbreaktion des Kupfers mit Natrium-diäthylthiocarbamat	40
4.4.	Diskussion der Eignung photometrischer Verfahren in der Mikrobestimmung freier Fettsäuren	40

5.	Die gaschromatographische Bestimmung der freien Fettsäuren	43
5.1.	Die gaschromatographische Bestimmungsmethode	43
5.2.	Probleme der quantitativen, analytischen Bestimmung freier Fettsäuren	45
5.3.	Die Derivatisierung der Fettsäuren	46
5.3.1.	Säure-katalysierte, direkte Veresterung der Fettsäuren	47
5.3.2.	Veresterung mit Säurechloriden	48
5.3.3.	Veresterung mit Diazomethan	48
5.3.4.	Veresterung mit Bor-Trifluorid	49
5.3.5.	Veresterung von Fettsäuren mit N,N-Dimethylformamid-Dialkylacetalen	50
5.3.6.	Schonende Veresterung über Silbersalze und Alkyl-Halogenide	51
5.4.	Neues Veresterungsverfahren für freie Fettsäuren mit Alkylhalogeniden an fester Kaliumcarbonatphase	51
5.4.1.	Reaktionsgeschwindigkeit	53
5.4.2.	Vollständigkeit der Reaktion	53
5.4.3.	Stabilität der Doppelbindungen	56
5.4.4.	Umesterung von Fettsäurenestern	56
5.5.	Die isotherme und temperaturprogrammierte gaschromatographische Trennung der Fettsäurenester	60
6.	Arbeitsvorschrift für die Bestimmung der freien Fettsäuren im Blutserum	63
6.1.	Probennahme	63
6.2.	Denaturierung der Proteine und Extraktion der freien Fettsäuren	63
6.3.	Überführung der extrahierten Fettsäuren in kleine Reaktionsgefäße	64
6.4.	Derivatisierung der Fettsäuren	65
6.5.	Gaschromatographische Bestimmung	66
6.6.	Das Gaschromatogramm der Fettsäurenmethylester und seine Auswertung	67

III

	Seite
7.	Ergebnisse 69
7.1.	Bestimmung der Standardabweichung an synthetischen Gemischen von Fettsäuren 69
7.2.	Die quantitative Auswertung der Fettsäurenanalyse mit Hilfe eines inneren Standards 69
7.2.1.	Einstellung der C ₁₇ -Standardlösung 71
7.3.	Die Standardabweichung des Verfahrens bei Serumproben von Normalpersonen mit homogenisiertem Serum 72
7.4.	Bestimmung der Standardabweichung von Serumproben diabetischer Patienten mit homogenisiertem Serum 73
7.5.	Anhang 75
8.	Zusammenfassung 79
9.	Literatur 81
10.	Lebenslauf

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Allgemeine Bemerkungen zur Entwicklung der Fettstoffwechselforschung

Der erste Fortschrittsbericht über das Fettgewebe, seinen besonderen Aufbau und Zelltyp, sowie die zum erstenmal getroffene Feststellung über die aktive Rolle des Fettgewebes im Gesamtstoffwechsel erschien 1948 von WERTHEIMER und SHAPIRO (1).

Diese Tatsache ist umso verwunderlicher, als schon vor über 100 Jahren die energieliefernde Rolle des Fettgewebes unter besonderen Stoffwechselbedingungen erkannt worden war. So war schon seit PETTENKOFER und VOIT 1866 (2) sowie später durch BENEDICT 1915 (3) erkannt worden, daß bei Kohlenhydratmangel wie z.B. im Hungerzustand und bei erhöhtem Energiebedarf wie z.B. bei körperlicher Arbeit (4) die Energieversorgung über eine Fettverbrennung gedeckt wird. Auch war schon früh die Fettfraktion der langkettigen Fettsäuren entdeckt worden (5,6).

Es ist erstaunlich, daß trotz dieser frühen Erkenntnisse es so viele Jahre unumstrittene Lehrmeinung sein konnte, daß dem Fettgewebe nur eine passive Depotfunktion für Fett zukommt. Diese Meinung war nicht zuletzt dadurch bestärkt und begründet, daß sich die Triglyceride calorisch sehr viel besser und ökonomischer für eine Energiedeponierung eignen, als z.B. Kohlenhydrate. Die Triglyceride können ohne zusätzliches Wasser in die Fettzellen eingelagert werden, was zur Folge hat, daß die Energiemenge von einer Kalorie in einem Gewicht von 125 mg Triglyceriden gespeichert werden kann (7), während für isotonisch gelöste Glucose ein Gewebegewicht von 5 g und konzentriert auf feuchtes Glykogen immer noch 580 mg/Cal erforderlich wären (7,8).

Diese Zahlen zeigen, daß dem Fett, welches in den Fettzellen gespeichert ist, eine fundamentale Bedeutung hinsichtlich

des Energiehaushaltes zukommt.

In Tab. 1 sind die Energieäquivalente der drei Hauptnährstoffe Kohlenhydrate, Eiweiße und Fette zusammengestellt. Daraus folgt, daß die Energiereserven eines 70 kg schweren normalgewichtigen Menschen, die in Form der Glykogenspeicher der Leber und der Muskulatur zur Verfügung stehen (ca. 400 g) maximal für eine 8-10-stündige Bedarfsdeckung ausreichen, während der Fettgehalt von durchschnittlich 10 kg eine Energieversorgung von über einem Monat sicherstellt.

Tab. 1:

ENERGIEPRODUKTION VERSCHIEDENER NÄHRSTOFFE (9)			
SUBSTANZ	VERBRENNUNGS- ENERGIE KCAL/100 g	ATP - GEWINN	
		MOL ATP/100 g	MOL ATP/MOL
GLUCOSE	374	20,0	36
TRISTEARAT	930	51,4	458
MYOSIN	425	19,9	-

Fettgewebe spielt somit eine zentrale Rolle in der kontinuierlichen Energiebereitstellung für den kontinuierlich ablaufenden Stoffwechsel, bei diskontinuierlicher Aufnahme der Nährstoffe.

Nicht zuletzt durch die Entwicklung leistungsfähigerer Bestimmungsmethoden vor allem durch DOLE 1956 (10) und AYERS 1956 (11), sowie IWAYAMA 1959 (12) wurde die Erforschung der Fettmobilisierung möglich. Durch diese Untersuchungen wurde gleichzeitig ein Zugang zum Verständnis der Mechanismen geschaffen, über welche eine Mobilisierung der Energiereserven

des Fettgewebes erfolgt. Obwohl der Gehalt an unveresterten freien Fettsäuren weniger als 2-3 % der gesamten Fettfraktion im zirkulierenden Blut ausmacht, ist aufgrund der extrem kurzen, ungefähr 2-4 min betragenden Halbwertszeit der freien Fettsäuren der Gesamtumsatz im Laufe eines Tages enorm hoch. (54,132,131)

Die freien Fettsäuren können hauptsächlich durch die Muskulatur und die Leber als Brennstoff zur Energieversorgung herangezogen werden.

Dabei wurde in zunehmendem Maße klar, in welch kompliziertem Wechselverhältnis der Fettstoffwechsel mit den anderen Stoffwechselprozessen verknüpft ist.

Neben der Entwicklung leistungsfähigerer Bestimmungsverfahren bedeutete die Einführung geeigneter Labormodelle einen großen Fortschritt.

RENOLD und Mitarb. führten 1957 (13) als Labormodell zur Untersuchung des Fettstoffwechsels das paarig angelegte epididymale Fettpolster der Ratte in die Forschung ein. Noch aussagekräftiger wurde die Fettstoffforschung durch die erfolgreiche Isolierung stoffwechselaktiver, intakter Fettzellen durch ROBBELL 1964 (14).

Diese Verfeinerung der Labormodelle machte es aber gleichzeitig wieder notwendig, noch leistungsfähigere und aussagekräftigere Mikroanalysenverfahren zu entwickeln, da die von DOLE und anderen eingeführten Verfahren für diese Labormodelle zu grob sind, nicht zuletzt wegen des recht beachtlichen Substanzbedarfes.

1.2. Zentrale Stellung der freien Fettsäuren als Energieträger zwischen dem Fettgewebe und den energieverbrauchenden Organen

Ein Überblick über die stoffliche Zusammensetzung der sog.

Lipide, die im Blut normalerweise vorzufinden sind, wird in Tab. 2 gegeben.

Tab. 2:

HAUPT-LIPID-KOMPONENTEN IM BLUT	
"FREIE FETTSÄUREN" FFS (TRANSPORTLEISTUNG: 200 g FFS/24 h)	
ENDOGENE LIPOPROTEINE:	
- VLDLP (VERY LOW DENSITY LIPOPROTEIN)	TRIGLYCERIDE
- LDLP (LOW DENSITY LIPOPROTEIN)	CHOLESTERIN
- HDLP (HIGH DENSITY LIPOPROTEIN)	FUNKTION UNKLAR
CHYLOMIKRONEN	NAHRUNGSFETTE

Vom morphologischen und funktionellen Standpunkt können wir heute von 3 großen Hauptgruppen der Plasmalipide sprechen:

- a) Die Chylomikronen (Tab. 2) dienen in der Hauptsache dem Transport der Nahrungsfette in Form der Triglyceride, welche 85-90 % ihres Gewichtes ausmachen. Die Chylomikronen werden am besten nach ihren Sedimentationseigenschaften in der Ultrazentrifuge (Tab. 3) als das Material definiert, welches beim Überschichten von Chylus oder Plasma mit

einem Medium der Dichte $1.006 \text{ (g/cm}^3\text{)}$ während der Zentrifugation mit 9500 g für 10 min an die Oberfläche floatet (15). Die Zusammensetzung der Chylomikronen-emulsion besteht aus 85-90 Gewichts-% Triglyceride und geringen Mengen von Phospholipiden und Cholesterin. Bei einer normalen mitteleuropäischen Ernährung werden über diese Chylomikronenfraktion täglich rund 100 g Fett in Form von Triglyceriden transportiert.

- b) Die zweite Hauptkomponente der Plasmalipide besteht aus den sehr heterogen zusammengesetzten Lipoproteinen. Die endogenen Lipoproteine (Tab. 3) werden analytisch hauptsächlich klassifiziert nach den Sedimentationskonstanten in der Ultrazentrifuge und den elektrophoretischen Eigenschaften in der Papier-, Agargel- oder Zelloseacetatelektrophorese. Grob aufgegliedert, wie in Tab. 2 aufgezeigt, kann man sagen, daß die Lipoproteine sehr niedriger Dichte (VLDLP) in der Hauptsache die Triglyceride transportieren, die Lipoproteine niedriger Dichte (LDLP) das Cholesterin. Über die Funktion der Lipoproteine mit hoher Dichte (HDL) ist wenig bekannt. Ein Hauptproblem in der Untersuchung der Lipoproteinfraktionen besteht in der Isolation einheitlicher Fraktionen, womit es außerordentlich schwierig ist, einzelne Lipoproteinmoleküle zu identifizieren, die in ihrem Proteinanteil sicher eindeutiger zu identifizieren wären, als das aufgrund ihrer Lipidzusammensetzung, ihrer Dichte, oder ihres Molekulargewichts möglich scheint.
- c) Vom chemischen Standpunkt aus gesehen, besteht die einfachste Fraktion der Serumfette aus den unveresterten Fettsäuren (UFS). Synonym gebraucht werden auch die Ausdrücke nichtveresterte Fettsäuren, (NEFS), aus dem englischen Sprachgebrauch non esterified fatty acid (NEFA), und freie Fettsäuren (FFS). Während die beiden Begriffe UFS und NEFS synonym gebraucht werden können, ist der

Tab. 3:

LIPID - KOMPONENTEN IM MENSCHLICHEN BLUTSERUM

BESTANDTEILE	DICHTE (g/ml)	$S_f^{*)}$	APO-LIPOPROTEIN	ELEKTROPHORESE
FREIE FETTSÄUREN FFS				
UNVERESTERTE FETTSÄUREN UFS				
NONESTERIFIED FATTY ACIDS NEFA				
LIPALBUMIN	> 1,210	-	ALBUMIN	ALBUMIN
ENDOGENE LIPOPROTEINE:				
LIPOPROTEINE HOHER DICHTE				
α -LIPOPROTEINE				
HIGH DENSITY LIPOPROTEIN HOLP	1,063-1,210	-	A-PEPTID	α_1
LIPOPROTEINE NIEDRIGER DICHTE				
β -LIPOPROTEINE				
LOW DENSITY LIPOPROTEIN LDLP	1,006-1,063	0-20	B-PEPTID	β
LIPOPROT#SEHR NIEDR.DICHTE				
PRAE- β -LIPOPROTEINE				
VERY LOW DENSITY LIPOPROTEINE				
VLDLP	< 1,006	20-10 ⁵	A,B-PEPTID	α_2
CHYLOMIKRONEN	< 1,006	400	A,B,C-Peptid	AUFTRAGSTELLE

*) S_f = FLUTATIONSEINHEIT NACH SVEDBERG ($= 10^{-13}$ cm/sec dyn g, bei 26 °C)
in NaCl-Lösung mit Dichte 1,063 g/ml

Ausdruck FFS nicht korrekt.

Chemisch gesehen handelt es sich hier um die mittel- bis langkettigen, gesättigten und ungesättigten, aliphatischen Monocarbonsäuren von C_{10} - C_{20} . Nach der Genfer Nomenklatur werden diese Verbindungen mit der Kohlenstoffzahl, der Anzahl und Lage der Doppelbindungen, wie am Beispiel der Arachidonsäure (Eicosatetraensäure) gezeigt, gekennzeichnet: $\Delta^{5,8,11,14}C_{20:4}$.

Unveresterte Fettsäuren im Plasma liegen hauptsächlich als Anionen vor. Aufgrund des pH-Wertes des Plasmas kann man erwarten, daß weniger als 1 % der Fettsäuren im undissoziierten Zustand vorliegen (16).

Nach frühen Hinweisen durch Hoppe-Seyler 1894 (5) veröffentlichten Szent-Györgyi und Tominaga 1924 (6) die ersten quantitativen Werte. Es herrscht heute Übereinstimmung in der Literatur darüber, daß die im menschlichen Plasma vorkommenden unveresterten Fettsäuren an Albumin gebunden (61) in einem Konzentrationsbereich von 0,2 bis 2,0 mVal/l vorliegen.

Das Albumin bindet die Fettsäurenanionen in unterschiedlich fester Form, die einmal abhängig ist von der Kettenlänge und zum andern vom Bindungsort am Albumin selbst. Die Assoziationskonstanten variieren über einen weiten Bereich von relativ schwacher Bindung, $k = 6 \times 10^2$ für Laureat bis zu $k = 1,1 \times 10^8$ für Oleat (17).

Diese unveresterten Fettsäuren, die nach Bedarf mehr oder weniger kontinuierlich aus dem Fettgewebe an das Blut abgegeben werden und den Hauptenergieträger für die oxidative Energieversorgung der Gewebe darstellen, nehmen im Fettstoffwechsel eine ähnliche Stellung und Funktion ein, wie die Glucose im Kohlenhydratstoffwechsel.

Über diese Lipidkomponente werden täglich beim Erwachsenen ungefähr 200 g unveresterte Fettsäuren im Blut zu den energieverbrauchenden Geweben transportiert, was bei der niedrigen Konzentration und der kurzen Halbwertszeit enorme Umsatzraten zur Folge hat. (135)

Der zur Energiegewinnung erfolgende oxidative Abbau der unveresterten Fettsäuren ist in fast allen Geweben möglich.

Abb. 1:

"FREIE FETTSÄUREN" FFS (= UNVERESTERTE FETTSÄUREN ODER NON ESTERIFIED FATTY ACIDS, UFS ODER NEFA)		
LIEFERQUELLE:	TRANSPORT:	VERBRAUCHSORT:
LIPOLYSE IM FETT- GEWEBE (TRIGLYCERID-LIPASE)	IM BLUTPLASMA ALS	LEBER MUSKULATUR UND ÜBRIGES GEWEBE
TRIGLYCERIDE	FFS-ALBUMIN- KOMPLEX	MIT AUSNAHME DES
HYDROLYSIEREN ZU FREIEN FETTSÄUREN UND GLYCERIN		ZENTRALEN NERVENSYSTEMS (ZNS)

Eine Ausnahme macht das zentrale Nervensystem, welches unveresterte Fettsäuren nicht direkt umsetzen kann.

Die Stellung und Funktion der unveresterten Fettsäuren

im Gesamtstoffwechsel wird in Abb. 2 dargestellt. Aus dieser Abbildung geht gleichzeitig deutlich hervor, daß diesen unveresterten Fettsäuren als Energieträger zwischen den Fettdepots und den energieverbrauchenden Geweben eine zentrale Stellung zukommt.

1.3. Kontrollmechanismen des Metabolismus des Fettgewebes

Das Konzept eines dynamischen Fettgewebes macht es notwendig, daß der Ablauf des Metabolismus einer gut abgestimmten Regulation unterliegt.

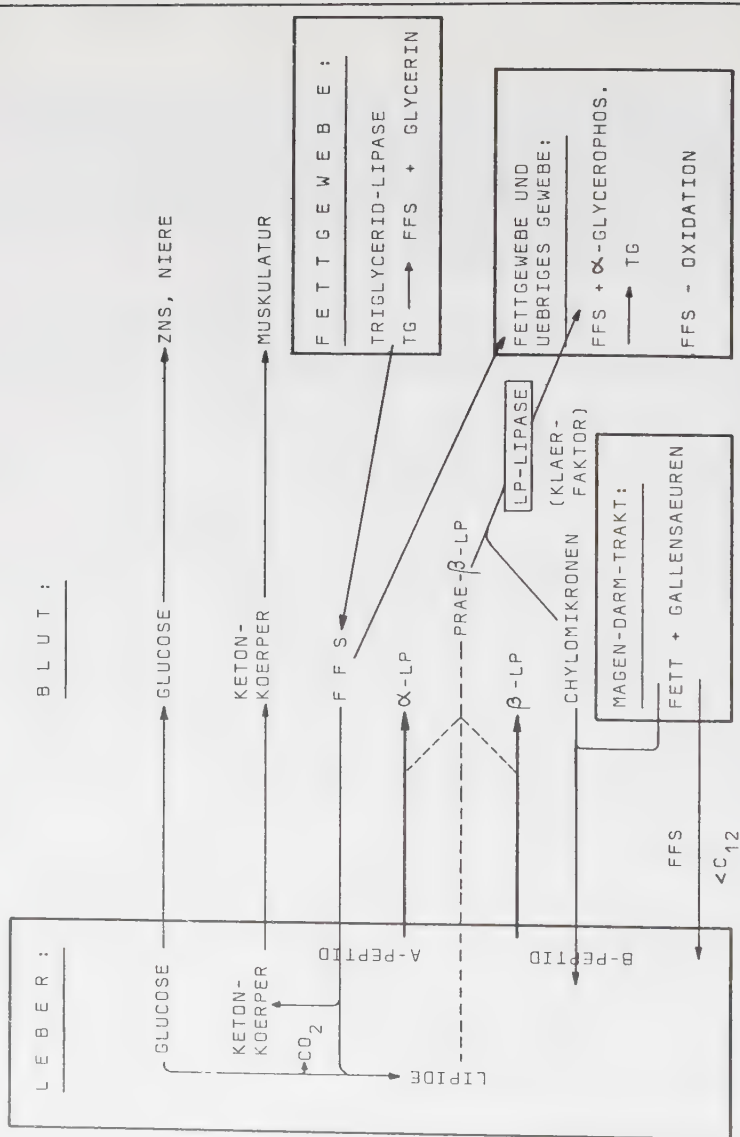
Die unveresterten Fettsäuren, die Hauptgegenstand der vorliegenden Untersuchungen sind, entstehen im Fettgewebe durch Lipolyse der Triglyceride. Eine zweite Quelle stellt die sog. Lipogenese dar, bei der aus Kohlenhydraten über Glucose Fettsäuren synthetisiert werden. Dieser Vorgang der Lipogenese ist sowohl in der Leber als auch im Fettgewebe lokalisiert (18), wobei das Überwiegen des Syntheseortes stark speziesabhängig ist (152).

Die Regelmechanismen, für den Fettstoffwechsel müssen verschiedenartige und in ihrer Auswirkung verschiedenwertige Angriffspunkte aufweisen. Im Grunde sind es biochemisch gesehen zwei Hauptprozesse, die für eine Regelung in Frage kommen. Einerseits kann der Vorgang der Lipolyse (hydrolytische Spaltung der Triglyceride) durch eine große Zahl sehr verschiedenartiger Substanzen sowohl inhibiert als auch stimuliert werden.

Die zweite prinzipielle Regelmöglichkeit liegt in der Beeinflussung der Reveresterung und der Triglyceridaufnahme aus dem Blut in das Fettgewebe.

In Tabelle 4 sind Substanzen mit inhibitorischer Wirkung und

NORMALER METABOLISMUS DER SERUM-LIPOPROTEINE



Substanzen mit stimulierender Wirkung auf den Vorgang der Lipolyse zusammengestellt.

Tab. 4:

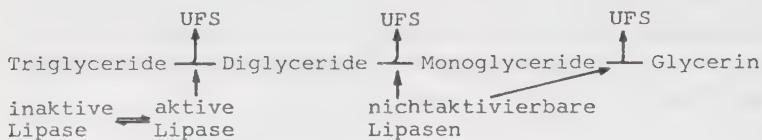
HEMMUNG DER LIPOLYSE	STIMULATION DER LIPOLYSE
INSULIN	KATECHOLAMINE
PROSTAGLANDINE	THYROXIN
METABOLITE: GLUCOSE	METHYLXANTHINE
LACTAT	GLUCAGON
PYRUVAT	CORTISON
KETONKÖRPER	WACHSTUMSHORMON
HYPOPHYSEN-HINTERLAPPEN-HORMONE:	ACTH
OXYTOCIN	TSH
VASOPRESSIN	SECRETIN
NICOTINSÄURE	
SALICYLSÄURE	
PYRAZOLE	
SYMPATHOLYTICA	

In der verschiedenen Wirkungsweise dieser Substanzen wird auch die Komplexität der Regulation des Lipidmetabolismus deutlich, denn es zeigt sich, daß Substanzen die einerseits die Triglyceridlipolyse stimulieren auch zu einer Erhöhung des Blutzuckerspiegels führen, während andere Substanzen wie z.B. Insulin den entgegengesetzten Effekt aufweisen.

Neben den hormonellen Regulationen bestehen außerdem mehrere nichthormonale Rückkopplungsmechanismen. So wird die Freisetzung der nichtveresterten Fettsäuren aus dem Fettgewebe nicht nur zum Beispiel durch Insulin und durch die Verfügbarkeit an Glucose geregelt, sondern ebenso durch Ketonkörper

gebremst, die ein Stoffwechselendprodukt des oxidativen Fettsäureabbaus darstellen (19).

Biochemisch gesehen ist die Endstrecke des Triglyceridabbaus über die Lipolyse die Reaktion, in der durch eine Aktivierung der Triglycerid-Lipase über Di- und Monoglyceride 3 Moleküle unveresterte Fettsäuren und 1 Molekül Glycerin entstehen (20,21).



Dieser Vorgang erfolgt primär in Fettgeweben, kann aber auch in der Muskulatur und in der Leber ablaufen. Während in bezug auf die unveresterten Fettsäuren im Fettgewebe dieser Endabbau reversibel ist, kann das frei werdende Glycerin zu einer Rückveresterung mit Fettsäuren nicht wieder verwendet werden, da dem Fettgewebe das Enzym Glycerokinase (E.C.2.7.1.30) fehlt.

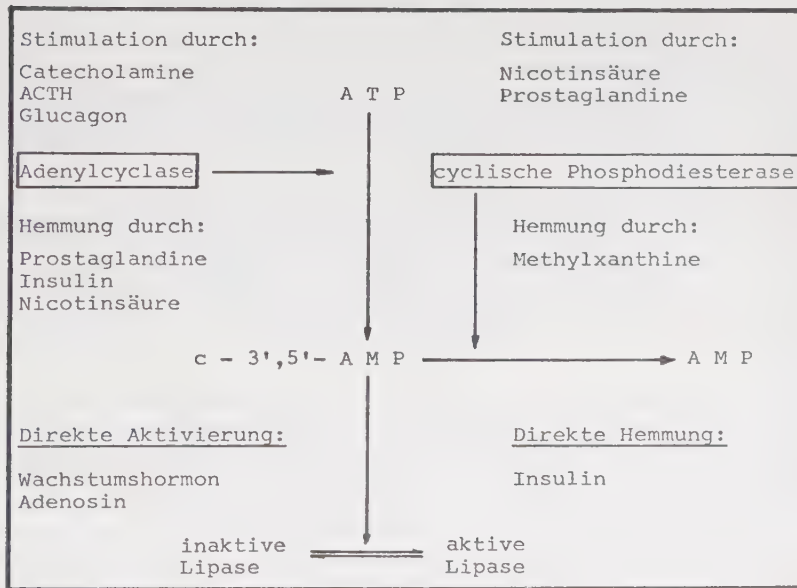
Über den Mechanismus der Hormonwirkung wurden nach der Entdeckung des zyklischen Adenosin-3',5'-Monophosphat (c-AMP) grundsätzliche Erkenntnisse gewonnen (22,23). Viele lipolytisch wirkenden Hormone weisen so einen gemeinsamen Mechanismus auf (24-28), aufgrund dessen man diese Hormone auch als "erste Informationsboten" bezeichnen kann (29). Diese Hormone (wie Catecholamine, Glucagon, ACTH, TSH und Vasopressin) aktivieren ein Enzym - die Adenylcyclase -, welche ihrerseits die Umwandlung des Adenosintriphosphat (ATP) in zyklisches 3',5'-AMP, den sogenannten "zweiten Informationsboten" katalysiert.

Diese Vorgänge erfolgen nachgewiesenermaßen unmittelbar vor einer Erhöhung der Lipolyse.

Der Anstieg der Lipolyserate erfolgt dabei linear mit dem Anstieg der intracellulären c-AMP-Konzentration in einem Bereich von 180-400 pMol c-AMP/g Fettgewebe. Darüberhinaus ist eine weitere Aktivierung nicht möglich (30).

Ein Schema des die Lipolyse stimulierenden Mechanismus geht aus Abb. 3 hervor.

Abb. 3:



Daraus ist auch ersichtlich, daß die Methyl-Xanthine einen anderen Angriffspunkt haben, als die oben angeführten lipolytisch wirkenden Hormone. Diese Substanzen inhibieren ein Enzym, welches für den Abbau des cyclischen 3',5'-AMP verantwortlich ist, nämlich die cyclische Phosphodiesterase. Diese Substanzen führen so über eine Blockierung des Abbaus zu einem erhöhten Spiegel an cyclischem AMP.

Andere Substanzen wie z.B. das Wachstumshormon zeigen erst nach einer Anlaufperiode von mehreren Stunden einen lipolytischen Effekt, der durch Substanzen verhindert werden kann, die die Proteinsynthese blockieren (z.B. Puromycin). Wie aus dem Schema in Abb. 3 über die verschiedenen Regelmechanismen hervorgeht, besteht die Wirkung einer zweiten Gruppe von Substanzen in der Inhibierung der Fettsäurefreisetzung aus dem Fettgewebe. In Tabelle 5 sind die Hauptvertreter dieser Substanzgruppe und deren Wirkungsmechanismus zusammengestellt.

Tab. 5:

Inhibitoren der Fettsäurenfreisetzung aus dem Fettgewebe (18)	
INSULIN	1. Erhöhung der Glucoseaufnahme, Bereitstellung von Glycerophosphat 2. Reveresterung der UFS 3. Inhibierung der Adenylcyclase 4. Direkte inhibitorische Wirkung auf die TG-Lipase
PROTAGLANDINE (E ₁ , E ₃ , F ₁ , F ₁₈)	1. Inhibierung der Adenylcyclase 2. Stimulation der Phosphodiesterase
NICOTINSÄURE	Wirkung wie Prostaglandine

Die Inhibierung der Lipolyse ist demnach einmal möglich durch Inhibierung der Adenylcyclase, oder durch Aktivierung der cyclischen Phosphodiesterase. Weitere Angriffspunkte bestehen sowohl in einer Beeinflussung der Triglyceridlipase direkt, als auch in einer Beeinflussung der Reveresterung, was einmal möglich ist über die Steuerung der Glucoseaufnahme und zum anderen durch Beeinflussung des Veresterungsvorganges selbst.

Der Hauptvertreter dieser Substanzklasse ist das Insulin,

welches mehrere Angriffspunkte hat: Insulin steuert die Aufnahme von Glucose in das Fettgewebe, was somit direkt die Konzentration an α -Glycerophosphat bestimmt. Außerdem steuert es über eine Inhibierung der Adenylcyclase und eine Inhibierung der Triglyceridlipase die Freisetzung von unveresterten Fettsäuren.

Die Wirksamkeit des Insulins an den verschiedenen Regelpunkten ist recht unterschiedlich. So ist die Freisetzung von unveresterten Fettsäuren wesentlich insulinempfindlicher, als die Glucoseaufnahme in das Fettgewebe (34,35).

Insulin hat einen weiteren sehr wichtigen Angriffspunkt in der Stimulierung der Lipoproteinlipase, was zu einer Beschleunigung der Triglyceridaufnahme in Form von freien Fettsäuren und Glycerin in das Fettgewebe führt.

Die in sehr niedriger Konzentration vorliegenden Prostaglandine vermögen über eine Inhibierung der Adenylcyclase und eine Aktivierung der cyclischen Phosphodiesterase ebenfalls die Freisetzung unveresterter Fettsäuren an das Blutplasma zu steuern.

Die interessantesten und vielfältigsten Angriffspunkte weist die Nicotinsäure auf: Einerseits inhibiert sie die Adenylcyclase und aktiviert die cyclische Phosphodiesterase, was zu einer erhöhten Bereitstellung freier Fettsäuren führt; andererseits fördert sie die Glucoseaufnahme in die Fettzelle und führt so zu einer Erhöhung der Reveresterungsrate.

1.4. Bemerkungen über den Zusammenhang zwischen Fettstoffwechsel und Kohlenhydratstoffwechsel

Die neben der Glucose zentrale Stellung der unveresterten Fettsäuren als Energieträger zwischen dem Fettdotat und den energieverbrauchenden Organen zeigt deutlich, daß es unumgänglich ist, in der Erforschung von Stoffwechselstörungen die Wechselwirkung und die Beziehungen zwischen dem Fett-

stoffwechsel und dem Kohlenhydratstoffwechsel mehr zu beachten.

Die Regulationsmechanismen zeigen diesen Zusammenhang in deutlicher Weise. Die oben aufgeführten, sehr verschiedenartigen Substanzen und Hormone zeigen nicht nur allein einen Einfluß auf das Fettgewebe, sondern betreffen ohne Ausnahme auch den Kohlenhydratstoffwechsel (18).

Excessive Plasmaspiegel unveresterter Fettsäuren werden bei einer Reihe verschiedenartiger Erkrankungen gefunden (z.B. Diabetes mellitus, Fettsucht, Acromegalie und Hyperthyreoidismus), wobei meist eine Resistenz gegenüber exogenem Insulin, eine abnormale Glucosetoleranz oder eben zusammengefaßt ein diabetisches Syndrom gefunden wird.

Die Untersuchungen dieser Wechselwirkungen und Zusammenhänge wird außerordentlich erschwert durch die Species-Unterschiede, die bei Benutzung von Labormodellen eine Berücksichtigung finden müssen (55,56,57,58). Heute erscheint es zweifelhaft, im Anstieg der unveresterten Fettsäuren im Plasma den auslösenden Grund einer Hyperglycämie zu suchen (31). Aufgrund der Bedeutung der lipolytisch wirkenden Hormone in der Pathogenese des diabetischen Syndroms kann heute geschlossen werden, daß beim idiopathischen Diabetes der Mangel an Insulin, als dem bedeutendsten lipolytischen Faktor, die auslösende Ursache ist und so die Erhöhung der unveresterten Fettsäuren im Plasma ein sekundäres Phänomen darstellt.

Beim Alters-Diabetes allerdings kann der Mechanismus in einer anderen Richtung ablaufen. Der Alters-Diabetiker zeigt meist Übergewicht, was zu einer peripheren Resistenz gegenüber dem zirkulierenden Insulin und damit zu einem Höhverbrauch an Insulin führen kann, woraus letzten Endes evtl. eine Erschöpfung der B-Zellen des Pankreas resultiert. So könnte diese sekundäre Form des Diabetes, die auch immer mit einer Erhöhung der Konzentration der freien Fettsäuren verknüpft ist, so ausgelöst sein, daß die unveresterten Fettsäuren ihrerseits zu einer Herabsetzung der Glucoseaufnahme führen

und so den Anstieg des Blutglucosespiegels verursachen (32,33). Verständlich wird dieser Vorgang umsomehr durch die Tatsache, daß, wie oben festgestellt wurde, die Fettzelle in bezug auf die Freisetzung von unveresterten Fettsäuren wesentlich insulinempfindlicher zu sein scheint, als sie es für die Aufnahme von Glucose ist (34,35).

Wie dem auch sei: Das Vorausgegangene sollte zeigen, daß den freien Fettsäuren als Parameter im Blutplasma eine überragende Bedeutung zukommt und zwar nicht nur im Hinblick auf die Funktion des Fettgewebes hinsichtlich der Energieversorgung, sondern gerade als Parameter für die Beurteilung der Intaktheit des Kohlenhydratstoffwechsels und der Regelmechanismen zwischen den beiden Hauptenergieversorgungsprozessen überhaupt. Aus all den Überlegungen und Tatsachenmaterialien kann der Schluß gezogen werden, daß für die Beurteilung der Stoffwechselfunktion die Fraktion der unveresterten Fettsäuren im Plasma einen empfindlichen und außerordentlich fein reagierenden Parameter darstellt.

2. Die analytische Chemie der freien Fettsäuren

2.1. Makrochemische Bestimmungsmethoden

Beim Studium der Literatur über die analytische Chemie der Fettfraktionen im Blutplasma stellt man mit Erstaunen fest, welch unüberschaubare Menge an Untersuchungsergebnissen und Untersuchungsverfahren schon zu einer Zeit in der Literatur zu finden sind, in welcher keineswegs die Stellung und Funktion des Fettgewebes im Gesamtstoffwechsel erkannt worden war.

Abgesehen von den schon sehr früh erschienen Arbeiten von PETTENKOFER und VOIT (2), HOPPE-SEYLER (5), BENEDICT (3) sowie SZENT-GYÖRGYI und TOMINAGA (6) erschienen bereits in den 40-er Jahren exakte Untersuchungen über die quantitative Zusammensetzung der Fettsäuren im Fettgewebe (36).

Die eingesetzten Verfahren beruhten in erster Linie auf gravimetrischen Bestimmungen von Trockenrückständen nach organischer Extraktion, oder nach mühevoller Auftrennung der Gesamtfette mit Hilfe der fraktionierten Destillation und fraktionierten Tieftemperatur-Kristallisation und ebenfalls quantitative Bestimmung über die Gravimetrie.

Es ist erstaunlich, wie genau die damals gewonnenen qualitativen und quantitativen Werte der Zusammensetzung der Fettsäuren mit den heute aufgrund hochleistungsfähiger, physikalischer Untersuchungsmethoden gewonnenen Werten übereinstimmen (Tab. 6) (37).

Tabelle 6:

Fettsäurenzusammensetzung menschlichen Fettgewebes:

Vergleich klassischer Analysenergebnisse, gewonnen an Autopsiematerial mit GLC-Analysenergebnissen, gewonnen aus Nadelbiopsie-Material

Fettsäure	Prozentuale Zusammensetzung des Fettes	
	GLC-Analyse (nach 37)	Klassische Methoden (nach 36)
12:0	0,7	0,5
14:0	3,3	3,5
14:1	0,6	0,4
16:0	19,5	25,0
16:1	6,9	6,4
18:0	4,2	7,0
18:1	46,3	45,9
20:4	0,2	0,7
20:isom.	1,7	1,2

2.2. Mikrobestimmungsmethoden

Eine Wende in der Erforschung des Fettstoffwechsels und seiner Bedeutung kam erst mit der Entwicklung hochleistungsfähiger Mikroverfahren. Eine Zusammenstellung der heute üblichen Verfahren geht aus Tabelle 7 hervor.

Seit dieser Zeit ist eine unüberschaubare Anzahl methodischer Arbeiten erschienen, die sich allerdings mehr auf Variationen einzelner Teilschritte, als auf grundsätzlich neue Bestimmungsprinzipien beziehen.

Methodisch gesehen finden 4 Bestimmungsprinzipien Anwendung: Gravimetrie, Acidimetrie, Photometrie und Gaschromatographie.

Ein Hauptproblem aller Bestimmungsverfahren liegt in der Standardisierbarkeit, welche bisher nur unbefriedigend gelöst wurde. DOLE und GORDON versuchen über eine Zumischung definierter Fettsäuren und Wiederfindungsversuche eine Standardisierung zu erreichen (38,39). Diese Ergebnisse können aber nur mit großer Vorsicht übernommen werden, da bis heute erst lückenhafte Kenntnisse der physikalischen Eigenschaften von Lösungsform, Bindungsverhältnissen usw. der unveresterten Fettsäuren im Blut vorliegen. Durch Zumischung allein wird sicherlich nicht der nativ vorliegende Lösungszustand erzielt, was sich nicht zuletzt auf die Extrahierbarkeit und Bestimmungsgenauigkeit stark auswirken muß. Die in den Tabellen 7 a-c gegebene Übersicht über die bisher vorhandenen Bestimmungsmethoden zeigt, daß es sich meist um indirekte Methoden handelt.

2.2.1. Gravimetrie

Die gravimetrischen Bestimmungsmethoden wurden wieder interessant, da heute Ultramikrowaagen mit Standardabweichungen von ± 50 ng keine Seltenheit mehr sind (6,40,41,76). Dabei ist allerdings eine sorgfältige und saubere Abtrennung der unveresterten Fettsäuren von den sehr kompliziert zusammengesetzten Lipidgemischen erforderlich, um die hohe Wägenauigkeit ausnutzen zu können.

2.2.2. Acidimetrische Verfahren

Von den indirekten Methoden der acidimetrischen Bestimmungen, wie sie schon 1929 von STEWART beschrieben wurden (41), haben sich vor allem die Modifikationen von DOLE und Mitarb., (10,42) sowie von TROUT (43) und GORDON (38,43,45) außer-

BESTIMMUNGSMETHODEN FÜR UNVERESTERTE FETTSÄUREN IM BLUTSERUM (I)		
Methode	Prinzip	Literatur (Auswahl)
GRAVIMETRIE	Alkoholextraktion Vakuum-Trocknung Mikrowägung	A. v. SZENT-GIÖRGY et al. (6) J. HIRTZ et al. (39)
Acidimetrie	Extraktion in organ. Lösungsm. Titration mit 0,01 N NaOH Indikatoren z. B. Bromthymol- blau oder Nilblau viele Modifikationen	C. STEWART et al. (41) B. D. DAVIS (59) V. P. DOLE et al. (10, 42) R. S. GORDON et al. (38) D. L. TROUT et al. (60)

BESTIMMUNGSMETHODEN FÜR UNVERESTERTE FETTSÄUREN IM BLUTSERUM (II)		
Methode	Prinzip	Literatur (Auswahl)
<u>PHOTOMETRIE:</u>		
Nethylenblau	Verteilung von MB zwischen Heptan und Ammoniak-Wasser	C. M. COLEMAN et al. (46)
Rosanilin	Reaktion der UFS mit Rosanilin bei 46°C	D. MENDELSON (47)
Hydroxamsäuren	Nach Veresterung der UFS Hydroxamsäurebildung	L. A. CARLSON et al. (48)
Nethylrot	Farbänderung im organ. Extrakt als Funktion der UFS-Konz.	K. KONITZER et al. (49) F. MOSINGER (87, 88)
Schwermetall-seifen	Extraktion der Cu-Seifen und photometrische Bestimmung von Cu Sehr viele Modifikationen hinsichtlich Schwermetall (Cu, Co, Ni) und Reagenzien (Natrium-diäthyl-dithiocarbamat, Diphenylcarbazid)	C. AYERS (11) Y. IWAYANA (12) W. G. DUNCOMBE (50) K. ITAYA et al. (51) M. NOVAK (52) S. LAURELL et al. (53)

BESTIMMUNGSMETHODEN FÜR UNVERESTERTE FETTSÄUREN IN BLUTSERUM (III)		
Methode	Prinzip	Literatur (Auswahl)
GAS-FLÜSSIG- CHROMATOGRAPHIE:	Extraktion der UFS in organische Lösungsmittel und Veresterung:	A. T. JAMES, A. J. P. MARTIN Biochem. J. <u>50</u> , 679 (1952) (62)
	Säurekatalytisch, 1 - 2 % HCl oder H_2SO_4 in 20fachem Methanol-Übersch. 1 - 2 h Rückfluß oder mit Alkohola- len Säurechloride z. B. $SOCl_2$ Diazomethan BF_3 , 5 - 10 % in CH_3OH N,N-Dimethylformamid-dialkyl- Acetale Über Silbersalze und Alkylhalog. Mit Alkylhalogeniden an K_2CO_3	G. G. McKEOWN et al. (118) T. S. RUNSEY et al. (117) F. E. LUDDY et al. (115) N. W. ALCOCK (149) M. GEE (150) SCHLENK et al. (109) L. D. METCALFE et al. (111) H. BRECHBÜHLER et al. (119) J. P. THENOT et al. (122) C. W. GEHRKE et al. (123) L. CLAISEN (125) F. K. KAWAHARA (126)

ordentlich belebend auf die Erforschung des Fettstoffwechsels ausgewirkt und finden auch heute weltweite Anwendung. Bei der Beurteilung dieses titrimetrischen Verfahrens sei auf zwei problematische Punkte dieser Methoden hingewiesen.

Obwohl es sich im Grunde nur um die Bestimmung der H-Ionenaktivität in einem organischen Extrakt handelt, der zudem eine beträchtliche Menge Schwefelsäure enthält, fehlen meist Aussagen über den Blindwert der Methode, der außerdem in seiner Größe sehr stark von der vorliegenden Fettsäurekonzentration beeinflusst wird; man darf nicht außer Acht lassen, daß die Fettsäuren, die ja im Plasma anionisch vorliegen, Detergentien-Eigenschaften aufweisen. Zweitens wird der Beitrag anderer saurerer, in organischen Lösungsmitteln löslicher Substanzen nicht berücksichtigt, die meist im Sinne einer Acidose mit den Fettsäuren simultanen Änderungen unterliegen.

Das für diese Verfahren erforderliche Probenvolumen stellt einen für die Anwendbarkeit begrenzenden Faktor dar. Bei der von DOLE vorgeschlagenen Mikromethode (42) ist immerhin noch ein Probenvolumen von 1 ml Plasma notwendig. Dieses Probenvolumen ist aber häufig noch zu groß, was vor allem bei der Erforschung an Modellen (Labortiere, Gewebspräparationen usw.) deutlich wird.

2.2.3. Photometrische Verfahren

Mit Ausnahme der ersten wenigen Verfahren, denen meist eine unspezifische Reaktion der freien Fettsäuren mit Farbstoffen zugrunde liegt (46-49), beruhen die anderen Verfahren (11,12,50-53,64-75,77-82,86,92) prinzipiell auf der Bildung von Metallseifen in gepufferten Lösungen und Extraktion dieser Salze in organische Lösungsmittelsysteme. Im organischen Extrakt erfolgt dann eine photometrische Bestimmung des zur Seifenbildung verwendeten Metalls. Die meisten

Arbeiten beruhen auf dem von AYERS 1956 (11) vorgeschlagenen Prinzip der Kupfersalzbildung und der photometrischen Bestimmung des Kupfers, die entweder mit Natrium-diäthyl-dithiocarbamat oder Diphenylcarbacid (DPC) vorgenommen wird.

Aufgrund dieses Bestimmungsprinzips, welches zunächst durch seine Einfachheit beeindruckte, sollte ein Mikroverfahren zur Bestimmung der Fettsäuren in kleinen Probenvolumina ausgearbeitet werden.

Über eingehende Untersuchungen zu diesem photometrischen Bestimmungsprinzip wird in Kapitel 4 berichtet.

2.2.4. Gas-Flüssig-Chromatographie

Aufgrund der Vorüberlegungen und der ausführlichen Voruntersuchungen kann man sagen, daß sich als einziges Trenn- und Bestimmungsprinzip das die Fettsäuren nach der Trennung direkt messende gaschromatographische Verfahren eignet.

Die Gaschromatographie stellt heute eines der leistungsfähigsten Trennverfahren dar. Es ist verwunderlich, wie wenig sich dieses moderne Verfahren in der klinischen Analytik einbürgern konnte. Obwohl die Bestimmung aliphatischer Carbonsäure durch JAMES und MARTIN 1952 (62) zu den ersten gaschromatographischen Anwendungsbeispielen zählt, hat es über 20 Jahre gedauert, bis sich dieses Verfahren auch allgemein mehr durchsetzen konnte.

Die Darstellung des gaschromatographischen Verfahrens und die Entwicklung eines neuen Veresterungsverfahrens werden in Kapitel 5 beschrieben.

3. Besondere Probleme der Mikroanalytik im Hinblick auf die Untersuchung biologischer Systeme

3.1. Probennahme

Ein schwer zu bewältigendes Hauptproblem in der biologisch-analytischen Forschung stellt die Probennahme dar. Je größer das Auflösungsvermögen eines mikroanalytischen Verfahrens wird, d.h. je kleiner die notwendige Probenmenge wird, desto mehr wird sich die in mikroskopischen Dimensionen vorzufindende Heterogenität und die inhomogene Zusammensetzung des zu untersuchenden Probenmaterials im Analysenergebnis widerspiegeln. Es muß also die Fragestellung sehr präzise formuliert werden: Wenn summarische Analysenergebnisse von einer Gewebeprobe gefordert werden, ist die Probenmenge nach unten dort limitiert, wo bei einer Verringerung der Substanzmenge Gewebelinhomogenitäten zur Auswirkung kommen.

Diese Schwierigkeit der Probeninhomogenität läßt sich in unserem Fall an Blutserumproben aufzeigen:

In den Tabellen 8 und 9 sind die Analysenergebnisse von Serumproben gegenüber gestellt. Bei der Serumserie 1 handelt es sich um 15 Bestimmungen der freien Fettsäuren aus demselben Serum, welches nach Koagulation des Blutes bei 4 °C und Zentrifugation mit 4000 g und 30-minütiger Dauer gewonnen wurde. ohne weitere Manipulationen wurden die 15 Proben aus dem Serumüberstand abpipettiert und mit der noch zu beschreibenden Analysenmethode untersucht.

Es zeigten sich bei dieser Serie in 30 % der Analysen sog. Ausreißerwerte, die zunächst nicht erklärt werden konnten.

Da vermutet wurde, daß diese Ausreißer aufgrund einer Probeninhomogenität zustande kamen - alle übrigen Analysenparameter waren für alle 15 Proben gleich - wurde eine zweite Analysenserie mit einem Serum vorgenommen, welches in üblicher Weise

Tabelle 8:

15 Parallelbestimmungen der unveresterten Fettsäuren im Serum; Die Serumproben wurden aus dem nach der Zentrifugation über dem Blutkoagel stehenden Serum abpipettiert

Konzentrationen in μ /Val/ml.

Proben Nr.	C ₁₄	C ₁₆	C _{16:1}	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}	Summe der UFS i. Serum
1	0.011	0.265	0.034	0.125	0.337	0.141	0.913
2	0.012	0.331	0.041	0.167	0.371	0.204	1.126
3	0.015	0.401	0.035	0.211	0.422	0.220	1.304
4	0.013	0.276	0.034	0.121	0.343	0.143	0.930
5	0.012	0.296	0.027	0.134	0.353	0.156	0.966
6	0.015	0.327	0.033	0.149	0.381	0.189	1.094
7	0.013	0.300	0.036	0.151	0.347	0.167	1.014
8	0.011	0.398	0.026	0.178	0.397	0.215	1.214
9	0.013	0.221	0.029	0.100	0.303	0.119	0.785
10	0.012	0.285	0.037	0.138	0.368	0.157	0.997
11	0.009	0.232	0.028	0.102	0.338	0.118	0.827
12	0.024	0.270	0.022	0.134	0.363	0.141	0.954
13	0.014	0.257	0.035	0.127	0.331	0.151	0.915
14	0.012	0.246	0.032	0.110	0.313	0.135	0.848
15	0.013	0.271	0.039	0.117	0.332	0.142	0.914
$\bar{x}$	0.013	0.292	0.032	0.138	0.353	0.160	0.987

Tabelle 9:

15 Parallelbestimmungen der unveresterten Fettsäuren im Serum;

Das Serum wurde nach dem Zentrifugieren vom Blutkoagel abgehebert und in einem Glasschliff-Reagensglas durch Schütteln homogenisiert.

Konzentrationen in $\mu\text{Val/ml}$.

Prob. Nr.	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	C _{16:1}	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}	Summe der UFS i. Serum
1	0.018	0.007	0.289	0.038	0.117	0.325	0.127	0.919
2	0.017	0.011	0.346	0.030	0.136	0.320	0.142	1.002
3	0.010	0.003	0.285	0.037	0.138	0.368	0.157	0.998
4	0.011	0.004	0.284	0.035	0.139	0.367	0.157	0.995
5	0.018	0.006	0.288	0.035	0.116	0.325	0.127	0.915
6	0.015	0.012	0.299	0.028	0.127	0.281	0.139	0.901
7	0.010	0.005	0.283	0.036	0.139	0.366	0.158	0.995
8	0.010	0.003	0.275	0.033	0.120	0.342	0.142	0.925
9	0.008	0.003	0.265	0.033	0.122	0.337	0.142	0.910
10	0.014	0.011	0.298	0.031	0.127	0.280	0.140	0.901
11	0.009	0.003	0.291	0.030	0.138	0.352	0.160	0.982
12	0.015	0.013	0.300	0.029	0.128	0.281	0.139	0.905
13	0.019	0.008	0.253	0.029	0.102	0.306	0.118	0.835
14	0.019	0.013	0.422	0.035	0.170	0.375	0.172	1.206
15	0.008	0.004	0.291	0.028	0.140	0.352	0.160	0.982
$\bar{x}$	0.013	0.007	0.298	0.032	0.131	0.332	0.145	0.958

gewonnen worden war, aber vor der Probennahme vom Blutkoagel abgehebert und durch kräftiges Umschütteln homogenisiert worden war.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengestellt. Es treten nur noch zwei Ausreißerwerte auf, die aber eindeutig auf Pipettierfehler zurückgeführt werden konnten.

Läßt man nun diese rein analytische Problematik, für die sich sinnvolle Lösungen anbieten, beiseite, so ergeben sich doch noch andere prinzipielle, durch das lebende System bedingte Störquellen beim analytischen Arbeiten, die bei der Interpretation des Analysenergebnisses strenge Berücksichtigung finden müssen:

- a) Die Tatsache, daß es sich bei Blut als Untersuchungsmaterial um ein lebendes Organ handelt, macht eine besondere und sorgfältige Behandlung des Probenmaterials hinsichtlich Transport und Lagerung erforderlich.
- b) Hinsichtlich der zu untersuchenden Parameter bedarf es ebenso einer sehr kritischen und außerordentlich sorgfältigen Kenntnis des Vorgangs der Probennahme, wofür auch gerade die unveresterten Fettsäuren ein sehr überzeugendes Beispiel darstellen:

Von GORDON und CARDON (63) wird ein Effekt hinsichtlich des psychischen Stresses bei der Venenpunktion mitgeteilt: Bei 13 Freiwilligen, denen mitgeteilt wurde, daß mit der Blutentnahme eine sehr unangenehme Untersuchung vorgenommen werden sollte, zeigte sich ein deutlicher, signifikanter Anstieg der Konzentration an unveresterten Fettsäuren über den Wert vor der Angstreaktion.

Bei Versuchen an Katzen konnte darüberhinaus eindeutig der Einfluß des sympathischen Nervensystems auf die Höhe der Konzentration der unveresterten Fettsäuren gezeigt werden. Nach dem Verletzungsreiz steigt die Konzentration

der unveresterten Fettsäuren sprunghaft an und fällt erst in einem Zeitraum von ungefähr 10 min auf einen konstanten Konzentrationswert ab. Diese Verhältnisse sind beispielhaft in Abb. 4 gezeigt.

- c) Da die Normalkonzentration der unveresterten Fettsäuren im Blutserum $0,2 - 1 \mu\text{Val/ml}$ beträgt und damit die Absolutmengen im Probenvolumen von $100 \mu\text{l}$ mit $1 - 10 \mu\text{g}$ sehr niedrig sind, ist streng zu überprüfen, daß die Probenaufbewahrungsart nach Abtrennung des Serums diese Konzentration nicht beeinflußt. Zur Überprüfung dieser Frage wurden Untersuchungen an Seren angestellt, die in verschiedener Weise aufbewahrt worden waren.

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse zusammengestellt, die an Serumproben gefunden wurden, welche direkt nach der Serumgewinnung (Zeitpunkt 0) gemessen, 8 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt, einen Tag bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt, 8 Tage bei -18°C im Gefrierschrank aufbewahrt und 4 Wochen tiefgefroren bei -18°C im Gefrierschrank aufbewahrt worden waren. Es zeigt sich dabei deutlich, daß die Aufbewahrung für ein paar Tage im Kühlschrank bei $+4^\circ\text{C}$ oder für längere Zeit bei -18°C die geringste Veränderung der Konzentration der unveresterten Fettsäuren mit sich bringt.

Die größte Störung fanden wir im Sinne eines Konzentrationsanstiegs bei der Aufbewahrung bei Zimmertemperatur. Nach 8 Stunden fanden wir bei Zimmertemperatur größtenteils einen Konzentrationsanstieg zwischen 20 und 30 %. Dieses Ergebnis allerdings stellt keinen konstanten Befund dar. Die Veränderung der Konzentration der unveresterten Fettsäuren wird sehr stark beeinflußt durch die Zusammensetzung des Serums selbst.

3.2. Handhabung kleiner Volumina

Die Probleme, die bei der Handhabung kleiner Volumina auf-

Nr.	C ₁₄	C ₁₆	C _{16:1}	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}	Summe UFS μVal/ml
1	0,015	0,337	0,028	0,274	0,414	0,164	1,232
2	0,030	0,472	0,026	0,509	0,616	0,333	1,986
3	0,020	0,252	0,0	0,242	0,287	0,097	0,898
4	0,011	0,236	0,0	0,222	0,298	0,106	0,873
5	0,011	0,191	0,0	0,232	0,208	0,126	0,768
6	-	0,137	-	0,182	0,151	0,104	0,517
7	-	0,249	-	0,232	0,216	0,176	0,877
8	0,004	0,132	-	0,161	0,178	0,112	0,587
9	0,003	0,118	-	0,139	0,129	0,096	0,485

- [1]: Erhöhung der UFS-Konzentration aufgrund des Operationsstressses (Narkose mit Äther, Tracheotomie, Carotidenligaturen, Katheteris.)
- [2]: Maximale Erhöhung der UFS-Konzentration nach Abtragung des Großhirns aufgrund der Enthemmung des im Stammhirn gelegenen Ursprungsgebietes des Sympathicus, 15 min nach Abtragung.
- [3]: Basiswerte, jeweils 15 min nach dem operativen Eingriff;
- [6]: nach caudal fortschreitende Ausschaltung der übergeordneten Hirnregion.
- [7]: 9 min nach i.v. Injektion von Adrenalin (5 μg/kg); Zeitpunkt maximaler Erhöhung physiologischer Kenngrößen (systolischer Blutdruck, Herzfrequenz)
- [8]: 15 min p.i.
- [9]: 30 min p.i.

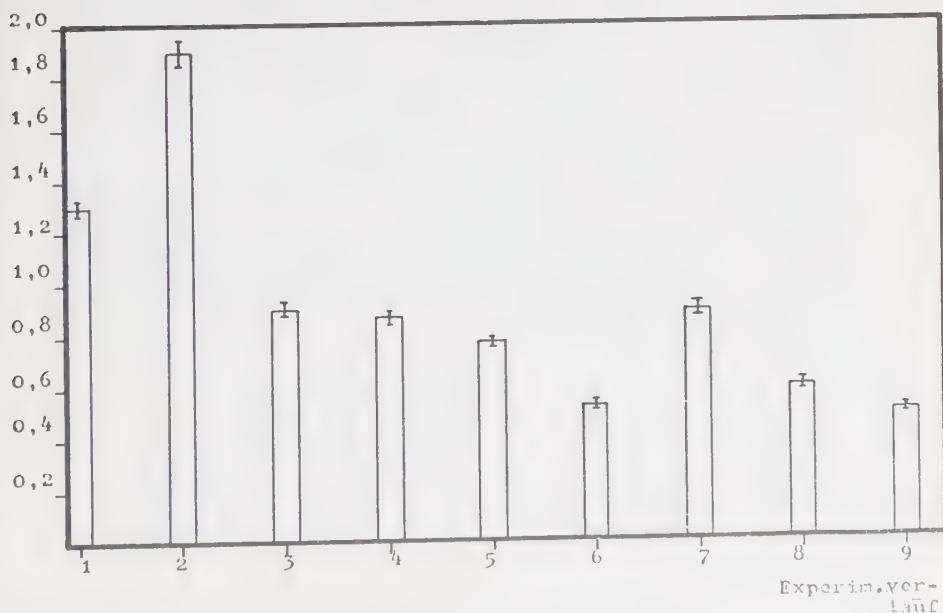


Tabelle 10:

Abhängigkeit der gefundenen UFS-Menge in Human-Serum von Art und Dauer der Probenaufbewahrung
 Das Blut wurde 1 h im Eisbad koaguliert, Blutkoagel abzentrifugiert, Serum abgehebert und durch
 Schütteln homogenisiert. Von diesem Serum wurden Einzelportionen für die Untersuchungen abgetrennt

Probe	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}	Summe der UFS im Serum µVal/ml
frisch	0,015 0,017 0,021	0,021 0,021 0,019	0,173 0,169 0,151	0,092 0,091 0,120	0,097 0,097 0,117	0,084 0,083 0,091	0,484 0,476 0,519
8 h Zimmer- temperat.	0,018 0,028 0,020 0,022	0,020 0,025 0,028 0,029	0,160 0,202 0,230 0,225	0,106 0,159 0,120 0,121	0,107 0,156 0,127 0,128	0,087 0,120 0,112 0,110	0,498 0,690 0,637 0,635
24 h Kühlschr. + 4 °C	0,023 0,018 0,016 0,015	0,027 0,025 0,022 0,020	0,219 0,171 0,175 0,163	0,133 0,089 0,095 0,110	0,137 0,098 0,099 0,120	0,114 0,081 0,091 0,085	0,654 0,482 0,498 0,513
8 Tage - 18 °C	0,016 0,011 0,020 0,025	0,022 0,020 0,015 0,019	0,170 0,170 0,169 0,153	0,098 0,095 0,110 0,115	0,106 0,090 0,095 0,094	0,086 0,087 0,087 0,092	0,498 0,473 0,496 0,500
4 Wochen - 18 °C	0,019 0,016 0,017 0,016	0,018 0,019 0,020 0,019	0,165 0,175 0,178 0,150	0,107 0,092 0,095 0,100	0,093 0,091 0,093 0,089	0,089 0,081 0,085 0,087	0,490 0,474 0,488 0,461
	0,016	0,019	0,168	0,096	0,091	0,084	0,474

treten, werden in der Literatur über mikroanalytische Verfahren ausgiebig erörtert (40). Die meisten Lösungsvorschläge die gemacht werden, betreffen das Arbeiten im wäßrigen System.

Ungleich größer werden die Schwierigkeiten, wie im vorliegenden Fall, wenn kleine Volumina organischer Lösungsmittelsysteme exakt dosiert werden sollen. Die üblicherweise verwendeten Kunststoffeinwegpipetten, meist aus Polypropylen, bieten zusätzliche Schwierigkeiten, da sie in den benötigten organischen Lösungsmitteln quellen. Bei strenger Einhaltung einer besonderen Anwendungsart kann der Einfluß der Lösungsmittelaufnahme, der Adsorptions- und Absorptionsvorgänge einigermaßen gering gehalten werden.

Wir untersuchten den Einfluß des von uns verwandten Lösungsmittelsystems Chloroform/Methanol (2/1, v/v) auf die Polypropylen-Einmalpipetten von Eppendorf. Beim erstmaligen Dosieren tropft das organische Lösungsmittel aus der Pipette aus. Nach mehrmaligem Aufziehen und Ausstoßen der Lösung kann ein stabiler Zustand erreicht werden, wobei auch organische Lösungsmittel relativ genau dosierbar sind. Nach fünf- bis sechsmaliger Wiederholung des Pipettiervorgangs allerdings wird der Einfluß der Quellung des Kunststoffs doch bemerkbar, was sich in einem Zurückziehen des Lösungsmittels in die Pipettenspritze zeigt. Um diesen Schwierigkeiten vor allem im Hinblick auf die Unsicherheit der evtl. Adsorption der Fettsäuren an die im organischen Lösungsmittel aufgequollene Oberfläche der Pipettenspitzen zu vermeiden, wurden zum genauen Dosieren der organischen Lösung der Fettsäuren besondere, gasdichte Glaspipetten mit Teflonstempel eingesetzt. Diese Pipetten erlauben eine genaue, verlustfreie Dosierung von organischen Lösungen.

3.3. Trennverfahren

Bei der mikroanalytischen Untersuchung kompliziert zusammen-

gesetzter Stoffgemische gibt es prinzipiell 2 Arbeitsmöglichkeiten.

Einmal kann über die Wahl eines leistungsfähigen, verlustfreien Trennverfahrens unter Anwendung eines mehr oder weniger unspezifischen Bestimmungsverfahrens gearbeitet werden. Als solche Trennverfahren bieten sich bei der Analytik der Lipide vor allem 2 Verfahren an, nämlich die Dünnschichtchromatographie und Extraktionsverfahren. Wenn es darum geht aus komplex zusammengesetzten Stoffgemischen einzelne Fraktionen schonend und möglichst verlustfrei abzutrennen, stellt die Dünnschichtchromatographie heute ein außerordentlich leistungsfähiges Verfahren dar.

Die zweite Arbeitsweise besteht darin, daß sich über die Wahl eines spezifischen und durch die Begleitstoffe ungestörten Bestimmungsverfahrens die korrekte und verlustfreie Auftrennung der Stoffe erübrigt.

Bei der Bearbeitung des hier vorliegenden Problems wurde eine Kombination beider Arbeitsprinzipien gewählt.

Einerseits wurde über ein neues Veresterungsverfahren ermöglicht, daß in dem unaufgetrennten Lipidgemisch, welches nach organischer Extraktion aus dem Serum vorliegt, eine verlustfreie und nicht durch Umesterungsprozesse verfälschte, direkte Veresterung der unveresterten Fettsäuren durchführbar wurde.

Andererseits wurde mit dem so hergestellten Lipidgemisch, in dem nach Veresterung die Fettsäuren als Methylester vorliegen, eine gaschromatographische Trennung durchgeführt, die es erlaubt die einzelnen Fettsäure-Methylester spezifisch und direkt zu messen.

4. Untersuchungen zu den photometrischen Bestimmungs- verfahren niedriger Konzentrationen freier Fettsäuren

4.1. Abtrennung der Metallsalze

Allen photometrischen Bestimmungsverfahren über die Metallsalzbildung liegt das von AYERS (11) eingeführte Prinzip der Abtrennung von Metallsalzen der Fettsäuren in organische Lösungsmittelsysteme zugrunde. Das Prinzip dieser Verfahren beruht darauf, daß die Metallsalze der Fettsäuren, meist als Kupfer-, Kobalt- oder Nickelsalze in organische Lösungsmittel extrahierbar sind. Im organischen Extrakt erfolgt dann die Bestimmung der Metallsalzkonzentration, die bei einer blindwertfreien Abtrennungsmöglichkeit ein direktes Maß für die Fettsäurekonzentration darstellen würde.

Bei diesen Bestimmungsverfahren treten prinzipielle und nicht standardisierbare Störungen auf:

Die optimale Kupfersalzbildung der langkettigen aliphatischen Monocarbonsäuren erfolgt bei einem $\text{pH} > 8$. Die gebildeten Metallsalze haben eine von der Konzentration abhängige, beträchtliche Detergenswirkung, was zur Folge hat, daß je nach Konzentration dieser Metallseifen mehr oder weniger größere Mengen des wäßrigen Systems in das organische Lösungsmittelsystem eingeschleppt werden. Das hat aber zur Folge, daß mit dem wäßrigen System auch das im Wasser gelöste Kupfersalz mit in die organische Phase verschleppt wird. Dieser Vorgang führt zu einer Zunahme des Kupferblindwertes, welcher in Abhängigkeit von der Fettsäurenkonzentration variiert.

Diese Störungen machen sich bei der Durchführung mikroanalytischer Bestimmungen so stark bemerkbar, daß aufgrund dieser nicht-standardisierbaren Blindwerteinstellung ein Einsatz dieses Bestimmungsprinzips im mikroanalytischen Bereich nicht möglich scheint.

Dieses Problem des nicht-standardisierbaren Blindwerts tritt

bei den üblicherweise angewandten makroanalytischen Bestimmungsverfahren nicht in Erscheinung, da es bei den dort eingesetzten großen Volumina an organischen Lösungsmitteln und wäßrigem Kupferreagenz über eine Sättigung zu einer Konstanz des Blindwerts kommt.

4.2. Untersuchungen zur Löslichkeit der Kupfersalze im organischen Lösungsmittelsystem

Mit Hilfe der Atomabsorptionsspektroskopie wurde das Problem der Löslichkeit der Kupfersalze im organischen Lösungsmittelsystem untersucht, und zwar einmal in sog. Leerlösungen, bei denen keine Fettsäuren anwesend waren und in Lösungen mit steigendem Fettsäuregehalt.

4.2.1. Das atomabsorptionsspektroskopische Meßverfahren

Gerät: Für die Untersuchungen stand ein Gerät von Perkin-Elmer, Modell 303, zur Verfügung.

Meßbedingungen:

Wellenlänge: 3247 Å

Spalt: 1 mm

Quelle: 4-Element-Hohlkathodenlampe mit 25 mA

Brenner: Perkin-Elmer-Premix

Brenngas: Luft/Acetylen

Probenaufnahme: 2 ml/min

Eichkurve:

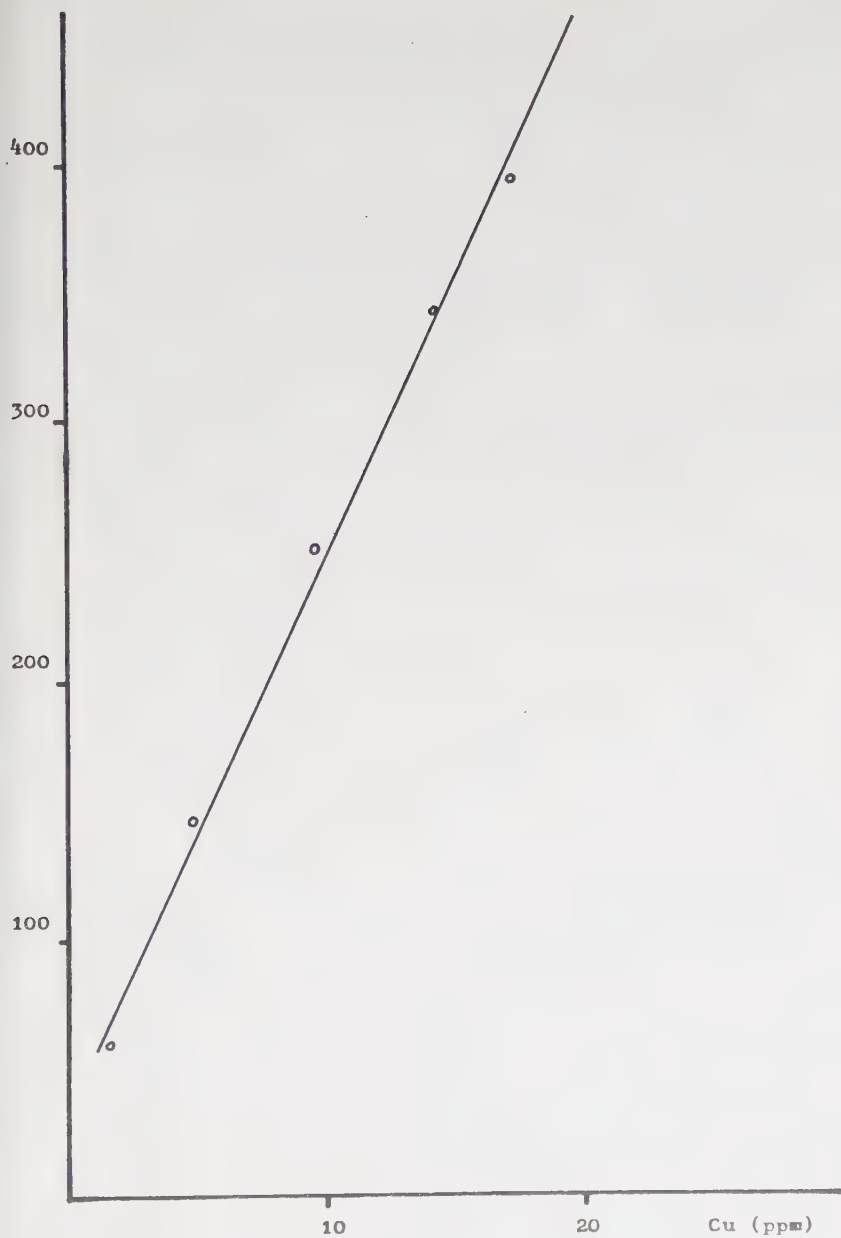
Die Eichkurve wurde für den aufgrund photometrischer Voruntersuchungen erwarteten Konzentrationsbereich von 1,6 - 19,2 ppm aufgenommen. Sie ist in Abb. 5 dargestellt.

Reagenzien:

Chloroform-Heptan-Methanol (28:21:1, v/v) (CHN), (80)

Abb. 5 Eichkurve für die atomabsorptionsspektroskopische Bestimmung von Kupfer

- 36a -



Cu-Pufferlösung: In 100 ml Lösung: 1,207 g $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
1,49 g Triäthanolamin, 3,5 ml 1 N NaOH, 33 g NaCl; pH 8,1

4.2.1.1. Versuche mit fettsäurefreien Lösungen

In dem organischen Lösungsmittelsystem ist es schwierig, exakte und definierte Konzentrationsreihen des Kupfersalzes herzustellen. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, wurde folgender Versuchsablauf gewählt:

Die nach Abtrennung in der organischen Phase gelösten Kupfersalze werden in einem zweiten Arbeitsgang in ein kupferfreies wäßriges Puffersystem zurückgeschüttelt. Darin wird dann mit Hilfe der Eichkurve der Kupfergehalt gemessen.

Versuchsdurchführung: 1 ml CHM werden mit 100 μl wäßriger, gepufferter Kupfersalzlösung 5 min heftig geschüttelt. Danach wird die Mischung zentrifugiert. Vom organischen Überstand wird vorsichtig ohne die Gefäßwand zu berühren ein aliquoter Teil abpipettiert.

Zum Zurückschütteln des Kupfers wird der aliquote Teil organischer Lösung (meist 0,5 ml) mit Triäthanolamin-Puffer 5 min geschüttelt und zentrifugiert. Das in die wäßrige Phase extrahierte Kupfer wird dann mit der Atomabsorptionsspektroskopie gemessen. Wie sich photometrisch mit Natriumdiäthyl-dithiocarbamat zeigen läßt, kann man mit diesem Auswaschen die organische Phase weitgehend kupferfrei waschen.

Als Ergebnis zeigte sich, daß aus den fettsäurefreien organischen Lösungen im Mittel aus 10 Versuchen Kupfermengen von ungefähr 10 ppm extrahierbar waren. Die Extraktion ist nach dem ersten Auswaschen praktisch vollständig. Die Einzelwerte sind in Tabelle 11 zusammengestellt. Diese Kupfermengen würden umgerechnet einen Fettsäuregehalt von ungefähr 450 $\mu\text{Val/l}$ Serum vortäuschen.

Tabelle 11:

Absorption (Skalenteile)	Cu-Konzentration ppm
242	10,0
238	9,8
232	9,5
264	11,0
252	10,5
256	10,6
256	10,6
264	11,0
262	10,9
230	9,4
$\bar{x}$ 249,6	10,33

4.2.1.2. Versuche mit fettsäurehaltigen Lösungen

In einer zweiten Versuchsreihe wurde überprüft, ob der Gehalt an Fettsäuren einen Einfluß auf die Höhe der in das organische Lösungsmittelsystem eingeschleppten Kupfermenge hat, oder ob über das Auswaschen mit dem wäßrigen Puffer eine Reinigung der organischen Phase möglich wäre. Um diese Fragen zu prüfen, wurden den gleichen Versuchsansätzen wie unter 4.2.1.1. jeweils steigende Mengen Palmitinsäure zugesetzt. Die Menge des extrahierbaren Kupfers wurde wieder mit Hilfe der Atomabsorptionsspektroskopie gemessen. Bei diesen Experimenten zeigte sich eine mit dem Fettsäuregehalt ansteigende Menge extrahierbaren Kupfers. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muß offen bleiben, ob der Anstieg an extrahierbarem Kupfer dadurch bedingt ist, daß eine größere

Menge der wäßrigen Kupfersalzlösung durch die Fettsäuren in die organische Phase eingeschleppt wurde, oder ob durch die wäßrige Pufferlösung nicht auch Anteile des fettsäuregebundenen Kupfers zurückgewaschen wurden. Die letztere Vermutung trifft dabei wahrscheinlicher zu, da sich nach wiederholter Extraktion kein konstanter Extinktionswert des in der organischen Lösung mit Natrium-diäthyl-dithiocarbamat komplexierten Kupfers ergibt. Wie die Meßergebnisse in Tabelle 11 zeigen, ergeben sich bei diesen Versuchen auch erhebliche Schwankungen, was ebenfalls zeigt, daß die Verteilungsvorgänge zwischen den beiden Phasen in Anwesenheit langkettiger aliphatischer Carbonsäuren sehr komplex sind.

Fettsäurenkonz. im organ. System uVal/ml	Absorption Skalenteile x_1, x_2, x_3	$\bar{x}_m$	Cu-Konzentration ppm	
0,1	238		9,8	
	286		12,1	
	306	277	13,0	11,6
0,4	366		16,0	
	328		14,1	
	430	375	19,0	16,4
0,6	452		19,9	
	360		15,6	
	382	398	16,7	17,4
1,0	452		20,1	
	532		22,9	
	446	477	19,8	20,9

4.3. Farbreaktion des Kupfers mit Natriumdiäthyl-dithio- carbamat

Abbildung 6a zeigt das Absorptionsspektrum von Kupferdiäthyl-dithiocarbamat in organischer Lösung (Chloroform-Heptan-Methanol 280:210:10, v/v):

Das Absorptionsmaximum liegt bei 440 nm.

Abbildung 6b zeigt im Vergleich dazu das Absorptionsspektrum von Cu-1,5-Diphenyl-carbohydrazid (151).

Da der Farbkomplex in organischer Lösung vorliegt, ergeben sich einige Schwierigkeiten hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Extinktionswerte und der Stabilität der Lösung.

Das Pipettieren der Lösung mit den üblichen Polypropylenpipetten brachte völlig unkontrollierbare Extinktionsänderungen, die erst bei Benutzung von Glasgeräten und Glaspipetten verschwanden. Die Stabilität der Lösung ist im organischen Lösungsmittel gering.

4.4. Diskussion der Eignung photometrischer Verfahren in der Mikrobestimmung freier Fettsäuren

Wenn wir die vorliegenden Untersuchungen zusammenfassen, können wir feststellen, daß folgende Punkte die Verwendung des photometrischen Prinzips auf der Grundlage der Extraktion der Schwermetallsalze der Fettsäuren in ein organisches Lösungsmittel in der mikroanalytischen Untersuchung der langkettigen Fettsäuren mit großer Skepsis betrachtet werden müssen.

- a) Die zunächst verführerische Einfachheit sollte nicht darüber hinwegtäuschen, daß dem Verfahren wegen des nicht standardisierbaren Blindwertes eine sehr große Unsicherheit anhaftet.
- b) Die Stabilität des in wäßrigem System vorliegenden Kupfer-

komplexes ist abgesehen von den sich im organischen System ergebenden arbeitstechnischen Schwierigkeiten in der Konstanthaltung der Zusammensetzung der Lösung nicht übertragbar auf die Verhältnisse im organischen Lösungsmittelsystem.

- c) Beim Handhaben der kleinen Lösungsvolumina mit den üblichen Kunststoffpipetten treten unkontrollierbare Extinktionsveränderungen auf.
- Aufgrund der enttäuschenden Ergebnisse der Versuche zur Entwicklung eines mikroanalytischen Bestimmungsverfahrens mittels photometrischer Bestimmungsprinzipien wurde von diesem Bestimmungsprinzip Abstand genommen.

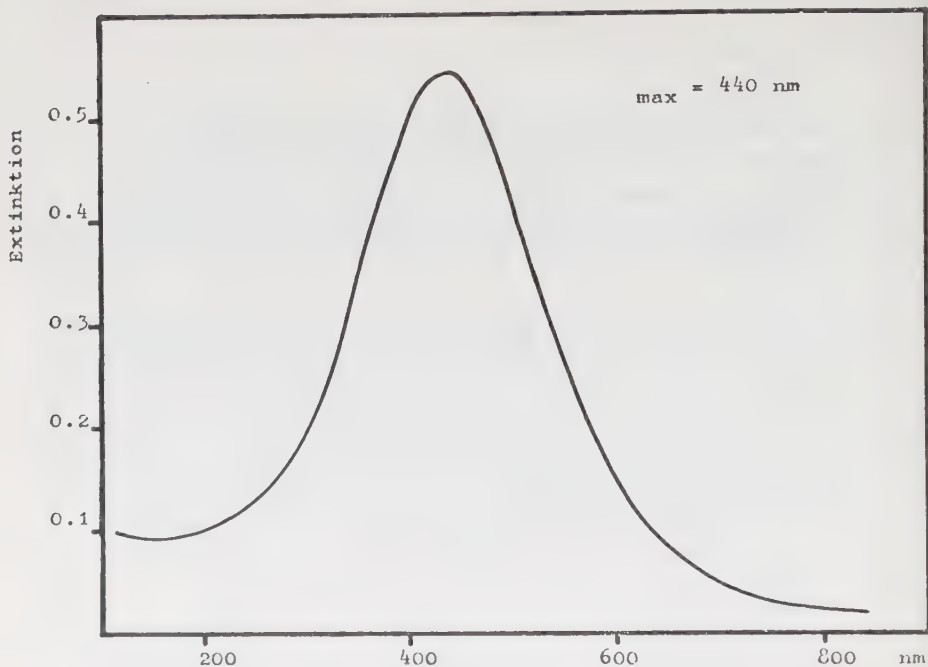
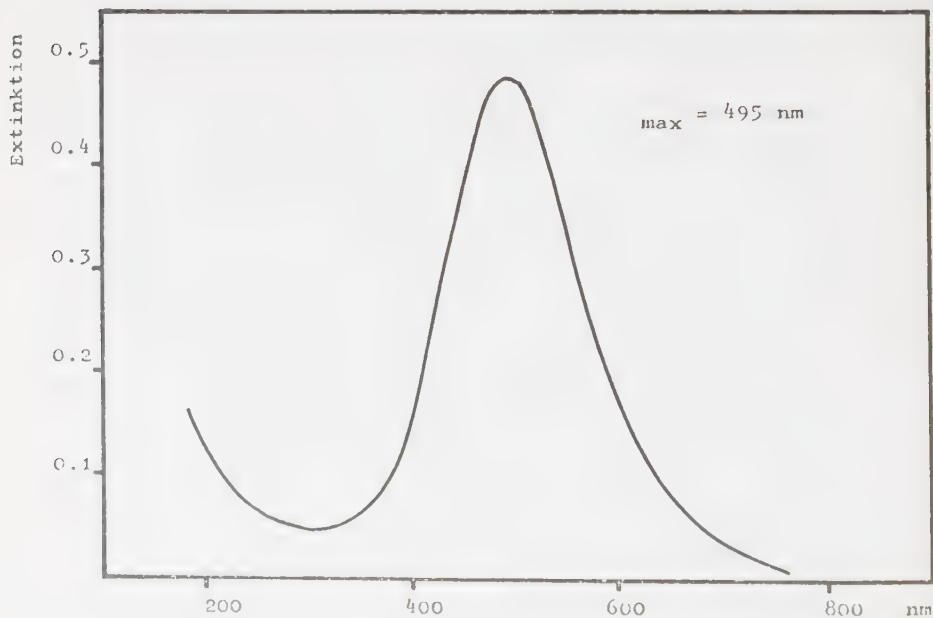


Abb. 6b

Absorptionsspektrum von Cu-1,5-Diphenyl-carbohydrazid
(nach: 151)

5. Die gaschromatographische Bestimmung der freien Fettsäuren

5.1. Die gaschromatographische Bestimmungsmethode

Unter den Fettstoffanalytikern herrscht weitgehend Einigkeit darüber, daß als einziges verlässliches Trenn- und Bestimmungsprinzip das gaschromatographische Verfahren zur qualitativen und quantitativen Erfassung der unveresterten Fettsäuren in Frage kommt (93,62,128,144,138).

Das Prinzip der hier angewandten Gasflüssigchromatographie beruht auf Verteilungsvorgängen zwischen gasförmiger und flüssiger Phase. Die Fettsäuren werden zur Erhöhung ihrer Flüchtigkeit zu Alkylestern derivatisiert. Sie werden in organischer Lösung mit Hilfe einer Microliterspritze auf die Säule aufgebracht. Nach der Verdampfung des Lösungsmittels und der gelösten Substanz erfolgt über Verteilungsvorgänge zwischen der flüssigen Phase der Säulenpackung und der Gasphase eine Auftrennung, die bei unpolaren Verbindungen an Säulenpackungen mit reinen Verteilungsvorgängen vor allem durch den Siedepunkt der Substanz bestimmt wird.

Das Trägermaterial hat in mehrerer Hinsicht Einfluß auf den Trennvorgang. In bezug auf seine chemische Inertheit, seine Korngröße und seine Poreneigenschaften (spezifische Oberfläche = Kontaktfläche) wirkt es sich vor allem bei niedriger Beladung mit flüssiger Phase auf die Trennung aus. Bei niedriger Beschichtung mit flüssiger Phase und großer spezifischer Oberfläche des Trägermaterials kann sich das Trägermaterial vor allem bei der Untersuchung von Estern mit mehreren Doppelbindungen durch Umwandlungen und Veränderungen der Probe oder durch adsorptionsbedingtes Tailing negativ auswirken.

Die am häufigsten angewandten Trägermaterialien sind in Tabelle 13 zusammengestellt.

Trägermaterialien^{*)} für die
Gaschromatographie in der
häufigsten Anwendung (83)

Chromosorb W
Gas Chrom P
Celite 545
Gas Chrom Q
Chromosorb P
Anakrom ABS
Chromosorb G

Unsere Untersuchungen wurden an Säulen durchgeführt, die mit Chromosorb W H P und vor allem Gas Chrom P als inertem Träger der flüssigen Phase gefüllt waren.

Sehr viele und recht unterschiedliche Substanzen mit mehr oder weniger hohem Siedepunkt werden als flüssige Phasen zur Beschichtung des inerten Trägermaterials verwendet.

Für die Auswahl der flüssigen Phase zur Analyse der Fettsäureester sind mehrere Gesichtspunkte maßgebend:

a) Maximale Arbeitstemperatur:

Sie wird festgelegt durch die Flüchtigkeit des Beschichtungsmaterials. Sie bestimmt im wesentlichen den Zeitbedarf für die Trennung. So ergibt sich bei Verwendung des am häufigsten für die Fettsäurenesteranalyse eingesetzten Diäthylen-Glycol-Succinat (DEGS) mit einer maximalen Arbeitstemperatur von 190-220 °C eine außerordentlich

^{*)} Kieselgur

lange Analysenzeit, die für die Auftrennung der Fettsäuren von C_1 - C_{30} über 2-3 Stunden betragen kann.

b) Polarität der flüssigen Phase:

Die Polarität wird nach ROHRSCHEIDER (85), definiert als die Summe der ΔI -Werte (Differenzen der Retentionsindices) von Squalen für Benzol, n-Butanol, 2-Pentanon, Nitropropan und Pyridin (84,97).

Bei einer unpolaren Beschichtung mit z.B. Apiezon-L werden die einzelnen Ester entsprechend ihren Siedepunkten getrennt.

Das bedeutet z.B., daß die ungesättigten Ester vor den gesättigten Homologen am Säulenausgang erscheinen, wobei aber die Retentionszeiten nur wenig verschieden sind, so daß die Trennung der gesättigten und ungesättigten Homologen sehr schwierig wird.

Je größer die Polarität des Beschichtungsmaterials ist, umso später erscheinen dagegen die ungesättigten nach den gesättigten homologen Estern.

Die in der gaschromatographischen Analyse der Fettsäureester bei weitem am häufigsten verwendeten flüssigen Beschichtungsphasen sind Diäthylen-Glycol-Succinat (DEGS), Apiezon-L und Silicon-SE-30 (83).

Die am Säulenausgang erscheinenden, fraktionierten Substanzen werden mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors, der mit einer Knallgasflamme arbeitet, indiziert

5.2. Probleme der quantitativen, analytischen
Bestimmung freier Fettsäuren

Die quantitative Analyse mit Hilfe der Gaschromatographie basiert auf dem Ausmessen der Peak-Flächen und Beziehung dieser Flächeninhalte zur quantitativen Zusammensetzung mit Hilfe eines Faktors für die Detektoransprechbarkeit. Die

Hauptproblematik bei der quantitativen Auswertung der gaschromatographischen Analyse besteht darin, daß das gaschromatographische Ergebnis von den Betriebsbedingungen des Gerätes stark beeinflusst wird (96). Da diese Betriebsbedingungen, wie Gasfluß, Säulentemperatur, Stabilität der Detektorflamme usw. von Messung zu Messung veränderlich sein können, werden zur Ausschaltung dieser Schwierigkeiten bei der Untersuchung von Substanzen eines Typs Referenzverbindungen eingesetzt. Das ist auch in unserem vorliegenden Fall möglich, da es nur auf die Erfassung der langkettigen Fettsäuren-Methylester ankommt. Als Bezugssubstanzen werden sowohl die Methylester der Myristin- und Palmitinsäure als auch die Methylester der Margarinsäure vorgeschlagen (89,90). Wir haben uns für die C_{17} -Säure entschieden, da sie normalerweise in den von uns untersuchten Untersuchungsmaterialien nicht vorkommt.

Neben diesen technischen Schwierigkeiten der Durchführung der gaschromatographischen Analyse treten aber auch schwerwiegendere, chemische Probleme auf, die weitaus schwerer zu bewältigen sind. Das Hauptproblem neben der quantitativen Extraktion der zu untersuchenden Fettsäuren aus dem biologischen Material besteht in der quantitativen und die Probe nicht verändernden Derivatisierung der Fettsäuren in die leicht flüchtigen Fettsäuren-Methylester.

5.3. Die Derivatisierung der Fettsäuren

Wenn auch auf der einen Seite die apparative und methodische Entwicklung der Gaschromatographie unvorstellbare Ausmaße angenommen und enorme Fortschritte gemacht hat, so leidet die Fettsäureanalytik dennoch bis heute unter dem Mangel geeigneter, angenehmer, und die Probe nicht verändernder, schonender Veresterungsmethoden.

Im folgenden wird eine Zusammenstellung der bis heute üblichen Veresterungsverfahren dargestellt, mit einer Gegenüber-

stellung der Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden für die Analyse der freien Fettsäuren (116,130,83,94,95).

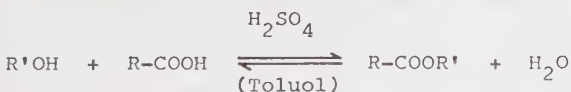
5.3.1. Säure-katalysierte, direkte Veresterung der Fettsäuren

Die klassische Veresterungsmethode besteht in der Umsetzung der Fettsäuren mit Methanol unter Mitwirkung einer kleinen Menge konzentrierter Schwefelsäure als Katalysator (94,95). Die Fettsäuren werden in einem Überschuß an Methanol und einer Volumenmenge konzentrierter Schwefelsäure, die ungefähr 1 Vol.% der Mischung entspricht, für eine bestimmte Zeit unter Rückfluß erhitzt.

Die Reaktionszeit ist abhängig von der Kettenlänge der vorliegenden Fettsäuren. Die Reaktionszeit ist umso länger, je länger die Fettsäurenkette ist.

Die Reaktionsgleichung dieses Verfahrens geht aus folgender Abbildung hervor.

Säurekatalysierte Veresterung:



Das Gleichgewicht wird dabei nach rechts verschoben, indem das Wasser durch Zugabe von Toluol als azeotropes Gemisch von Wasser, Alkohol und Toluol abdestilliert wird.

Zu diesem Verfahren wurden zahlreiche Modifikationen veröffentlicht (98-107,117,118).

Nachteil dieses Verfahrens, sowie vieler der noch folgenden, ist die Notwendigkeit der Abtrennung der im Untersuchungsmaterial vorliegenden Ester und Triglyceride, wenn es auf die analytische Bestimmung der freien Fettsäuren allein ankommt. Die Veresterungsmethode liefert beim Vorliegen von freien Fettsäuren und Fettsäureestern die Fettsäureester aller

im System vorhandenen Fettsäuren. Nach VORBECK et al. (1961) (108) tritt bei diesem Verfahren kein signifikanter Verlust an ungesättigten Fettsäuren auf.

5.3.2. Veresterung mit Säurechloriden

Die Fettsäuren werden bei diesem Verfahren mit Thionylchlorid (kp. 79 °C) in die Säurechloride überführt und anschließend mit dem entsprechenden Alkohol in die Ester umgesetzt (95,149). Das Thionylchlorid eignet sich für diese Reaktion deshalb besonders gut, weil es leicht durch Destillation aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden kann. Die Reaktionsgleichungen zu diesem Veresterungsverfahren gehen aus Abbildung 6 hervor.

Veresterung mit Säurechloriden:



Vorteilhaft ist, daß beide Reaktionen irreversibel sind und somit die Reaktionen vollständig ablaufen (150). Die Gefahr der Seitenreaktion ist bei diesem Verfahren allerdings groß, was vor allem Hydroxy-, Keto-, ungesättigte, Di- und Tri-Carboxylsäuren betrifft.

5.3.3. Veresterung mit Diazomethan

Die Veresterung mit Diazomethan verläuft außerordentlich rasch und vollständig. Das Reagenz muß jeweils frisch bereitet werden, um gute Resultate zu erzielen.

Diazomethan wird hergestellt, indem man eine 50 %ige KOH-Lösung mit einer ätherischen Lösung von N-Nitrosomethyl-

Harnstoff mischt (95).

Zur Darstellung der Fettsäureester wird die ätherische Lösung der organischen Säure mit dem Diazomethan-Reagenz umgesetzt (95, 109, 99, 110, 114, 113, 144, 146, 145, 118).

Die folgende Reaktionsgleichung gibt den Ablauf der Veresterungsreaktion wieder (Abb. 7).

Veresterung mit Diazomethan:



Der Verwendung von Diazomethan als Veresterungsreagenz stehen mehrere Bedenken entgegen.

Das Reagenz ist nicht nur außerordentlich toxisch und explosiv, auch die Veresterungsergebnisse müssen mit Vorsicht interpretiert werden. Diazomethan kann zu strukturellen Veränderungen der organischen Säuren führen, z.B. durch die Bildung von Pyrazolinen an Doppelbindungen. Zum weiteren kann durch Freisetzen von Fettsäuren aus Glyceriden über eine Verseifung und Strukturänderung an Doppelbindungen (113) eine Veränderung der Probenzusammensetzung eintreten.

5.3.4. Veresterung mit Bor-Trifluorid

Die Umwandlung der Fettsäuren in ihre Ester kann mit Bor-Trifluorid und Methanol außerordentlich schnell erfolgen (2 min). Dabei werden die Fettsäuren in einem Überschuß des Reagenz am Rückfluß gekocht. Diese Veresterungsmethode wurde von METCALFE und SCHMITZ 1961 in die gaschromatographische Fettsäurenanalyse eingeführt (111). Die Reaktionsgleichung zeigt im folgenden den Ablauf der Reaktion (Abb. 8).

Veresterung mit Bortrifluorid:

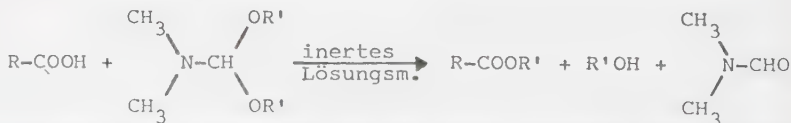


Diese Methode eignet sich nicht für die Veresterung von Säuren, die Epoxy-, Hydroperoxy-, Hydroxy- und Cyclopropen-Gruppen aufweisen. Die Veresterungsmethode mit Bor-Trifluorid und Methanol eignet sich vor allem wegen der extremen Reaktionsgeschwindigkeit für die Veresterung von Säuren, bei denen Seitenreaktionen nicht ablaufen können (112).

5.3.5. Veresterung von Fettsäuren mit N,N-Dimethylformamid-Dialkyl-Acetalen

Diese Veresterungsmethode wurde 1963 von BRECHBÜHLER, BÜCHI, HATZ, SCHREIBER und ESCHENMOSER sowie von VORBRÜGGEN zur Veresterung von Carboxylsäuren mit guter Ausbeute eingeführt (119, 121). Diese zuerst von MEERWEIN beschriebene Reaktion (120) wurde von THENOT und anderen (122) für die gaschromatographische Analyse von Fettsäuren eingeführt. Die Reaktionsgleichung zeigt den Ablauf der Reaktion (Abb. 9).

Veresterung mit N,N-Dimethylformamid-Dialkylacetalen:



Über diese Veresterungsmethode ist es möglich, eine quantitative Veresterung der Fettsäuren durchzuführen. Es können dabei sowohl die Methyl-, als auch Propyl-, Butyl-Ester dar-

gestellt werden. Zur quantitativen Veresterung wird bei einer Temperatur von 60 °C eine Zeit von 10-15 min benötigt.

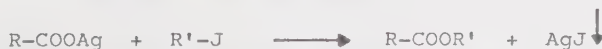
Angaben über Seitenreaktionen, Stabilität der Doppelbindungen und evtl. Umesterungsreaktionen werden nicht mitgeteilt.

5.3.6. Schonende Veresterung über Silbersalze und Alkyl-Halogenide

Wenn die bisherigen Veresterungsmethoden bei einer Probe wegen der Gefahr der Isomerisierung nicht anwendbar waren, wurde die Veresterung über die Silbersalze der Fettsäuren mit Alkyl-Halogeniden durchgeführt (94,95,123).

Das folgende Reaktionsschema gibt den Veresterungsablauf wieder (Abb. 10). Dabei werden die trockenen Silbersalze in wasserfreiem Äther, Benzol oder absolutem Alkohol mit Alkyl-Halogeniden am Rückfluß erhitzt.

Veresterung über die Silbersalze:



Nach GEHRKE und anderen (123) kann man die Silbersalze über die Kaliumsalze der Fettsäuren erhalten, indem die Kaliumsalze mit Silbernitrat umgesetzt werden.

Dieses für Doppelbindungen schonende Verfahren ist nicht nur recht umständlich, sondern erfordert auch Substanzmengen, wie sie für die Analyse kleiner Blutplasmaproben nicht zur Verfügung stehen.

5.4. Neues Veresterungsverfahren für freie Fettsäuren mit Alkyl-Halogeniden an fester Kaliumcarbonatphase

Wie die vorausgehende Übersicht zeigt, sind die bisher vor-

handenen Veresterungsverfahren aus vielen Gründen für unsere Versuche nicht geeignet. Das neue Verfahren sollte mehrere Bedingungen erfüllen.

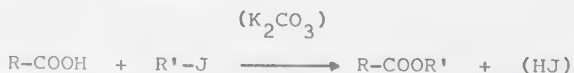
- a) Das Verfahren sollte schonend sein und ungesättigte Fettsäuren ebenso quantitativ und ohne Isomerisierung und Zerstörung erfassen, wie gesättigte.
- b) Das Verfahren sollte nicht zu Umesterungen führen.
- c) Das Verfahren sollte für den Analytiker möglichst bequem und angenehm sein; da das Verfahren für Routinezwecke eingesetzt werden soll, ist es erforderlich, daß die verwendeten Reagenzien nicht über das übliche Maß hinaus toxische und lästige Eigenschaften aufweisen.
- d) Die verwendeten Reagenzien sollten möglichst stabil und unkompliziert handhabbar sein.

Aufgrund dieser Forderungen wurde ein Veresterungsverfahren für die Fettsäuren ausgearbeitet, welches bereits 1894 durch CLAISEN zur Ätherbildung von Phenolen (125) verwendet wurde und 1968 durch KAWAHARA zur analytischen Bestimmung von Phenolverunreinigungen in Gewässern in die Gaschromatographie eingeführt wurde (126).

Diese Veresterungsmethode wurde schließlich 1973 für die gaschromatographische Analyse von Barbitursäuren durch DÜNGES angewandt (127). Der Ablauf der Reaktion ist einfach und erfordert keinerlei besondere Vorkehrungen. Die Reaktion läuft an der festen Phase des Kaliumcarbonats ab.

Der Reaktionsablauf wird in der folgenden Reaktionsgleichung dargestellt (Abb. 11).

Veresterung nach CLAISEN:



Für die Vorbereitungen und Aufbewahrung der Reagenzien sind keine besonderen Vorsichtsmaßnahmen erforderlich. Das Kaliumcarbonat wird im Trockenschrank bei 110°C aufbewahrt. Es wird in einem Porzellantiegel vorher sehr fein verrieben. Das Alkyl-Halogenid, für unsere Routineversuche wurde Methyljodid verwendet, wird in einer 50 Vol.-%igen Lösung in Essigsäureäthylester angesetzt und in einer braunen Glasflasche im Kühlschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Die Veresterung der Fettsäuren läuft vollständig ab. Die Reaktionszeit ist abhängig von der Kettenlänge der Fettsäure und beträgt für die langkettigen Säuren etwa 70-80 min.

Die Veresterungsreaktion wird in besonderen Glaskölbchen durchgeführt, die mit einem NS-5-Polyäthylenstopfen und Stahlfedern verschlossen werden. Die Proben werden im verschlossenen Reaktionsgefäß eine Stunde bei 90°C im Luftbad erhitzt (Abb. 12).

Die genaue Durchführung und Arbeitsvorschrift für die Bestimmung der freien Fettsäuren mit Hilfe des neuen Veresterungsverfahrens werden in Kapitel 6 ausführlich beschrieben. Zur Kennzeichnung des Veresterungsverfahrens seien im folgenden noch einige Punkte im einzelnen dargestellt:

5.4.1. Reaktionsgeschwindigkeit

Die Veresterung bedarf mit wachsender Kettenlänge der Fettsäure einer längeren Reaktionszeit.

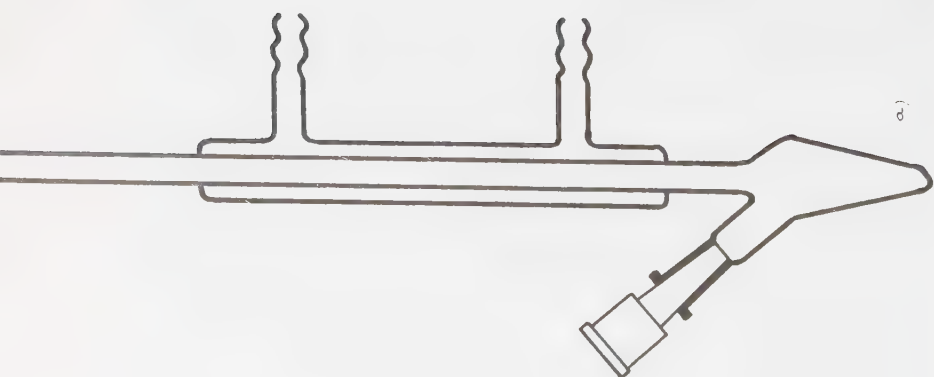
In Abb. 13 ist der Reaktionsverlauf für Stearinsäure dargestellt.

5.4.2. Vollständigkeit der Reaktion

In einer Versuchsreihe wurde die Vollständigkeit der Veresterungsreaktion für eine Reihe von Fettsäuren untersucht.

Abb. 12

Gefäße für Extraktionen
und Veresterungen



a)



b)



c)

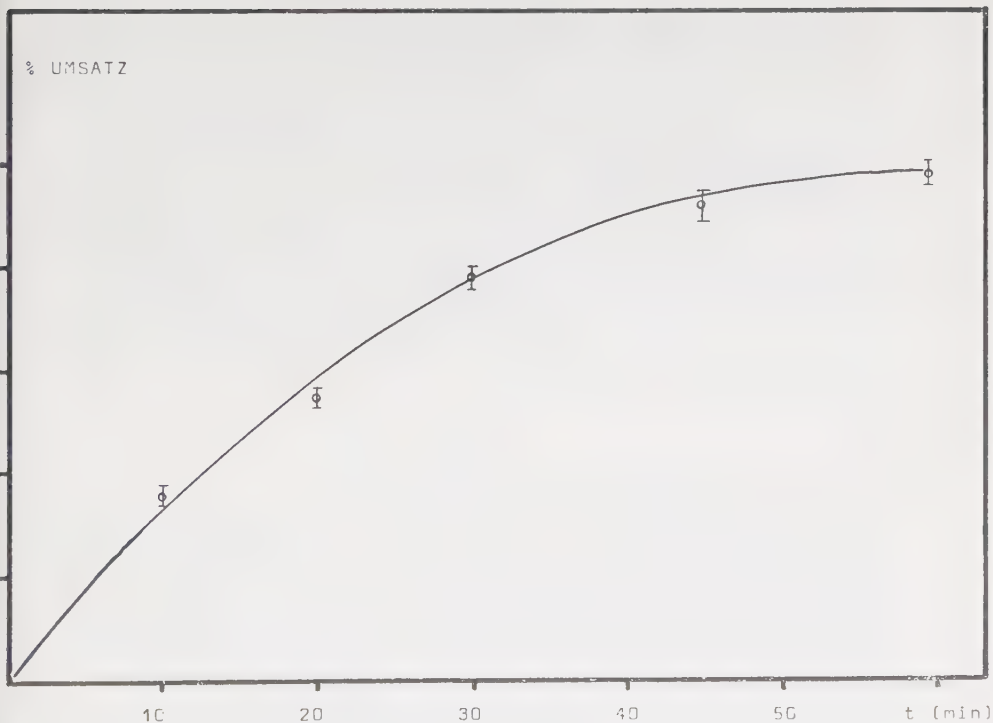


d)

Abb. 13

REAKTIONSVERLAUF BEI DER VERESTERUNG ALIPHATISCHER
MONOCARBONSAEUREN MIT ALKYLHALOGENIDEN UEBER K_2CO_3

ANSATZ: 50 μ l PALMITINSAEURE-LOESUNG (1 μ g/ μ l) in
ESSIGSAEURE-AETHYLESTER
50 μ l CH_3J UEBER FESTEM K_2CO_3
VERSCHLOSSENES REAKTIONSGEFAESS
 $T = 90^\circ C$



Am Beispiel der Stearinsäure sollen diese Versuche dargestellt werden. In einen Veresterungsansatz werden äquimolare Mengen freier Stearinsäure und Margarinsäuremethylester mit Methyljodid umgesetzt. Wie aus der Abb. 14 hervorgeht, ist nach einer Stunde die Stearinsäure unter den gegebenen Reaktionsbedingungen vollständig verestert. In Vorversuchen wurde sichergestellt, daß für Stearinsäure- und Margarinsäure-Methylester die gleiche Relation der Peakfläche und Estermenge besteht. Diese Relation gilt auch für alle Ester der im Blutserum zu findenden Fettsäuren.

5.4.3. Stabilität der Doppelbindungen

In einer weiteren Versuchsreihe wurde untersucht, ob die Veresterungsmethode einen Einfluß auf die Doppelbindungen der ungesättigten Fettsäuren hat.

Wie sich aus dem Experiment mit Ölsäure ($C_{18:1}$) beispielhaft zeigt, erfolgt bei diesem Veresterungsverfahren keine Isomerisierung und Beeinflussung der Doppelbindung. Auch nach längeren Veresterungszeiten (über 2 Std.) werden beim Verestern von Ölsäure, Linolsäure, keine Ester der gesättigten Homologen gefunden (Abb. 15).

5.4.4. Umesterung von Fettsäurenestern

Eine wichtige Frage für das vorliegende mikroanalytische Verfahren bestand darin, ob es bei der hier angewandten Veresterungsmethode zu Umesterungen von Fettsäurenestern kommt. Im vorliegenden Verfahren sollte zur Reduzierung der Fehlerbreite auf eine Abtrennung der einzelnen Lipidfraktionen verzichtet werden. Dieses Vorgehen war aber nur dann möglich, wenn es bei dem hier gewählten Veresterungsverfahren im Laufe der Veresterung nicht zu einer Umesterung aus den Triglyceriden und übrigen Fettsäurenestern des Bluts kommt.

Am Beispiel der Palmitinsäure und am Beispiel von dünn-schichtchromatographisch abgetrennten Triglyceriden wird im folgenden Experiment gezeigt, daß das hier gewählte Veresterungsverfahren nicht zu Umesterungen führt.

In einem Reaktionsansatz wurde zunächst der Palmitinsäure-äthylester hergestellt. Anschließend wurde im selben Reaktionsgemisch noch einmal eine Veresterung mit Methyljodid durchgeführt. Dabei zeigt sich, daß auch nach dem zweiten Veresterungsvorgang nur Palmitinsäureäthylester nachweisbar war. Dieses Experiment wurde umgekehrt. Auch bei der wiederholten Veresterung des zunächst hergestellten Palmitinsäuremethylesters mit Äthyljodid bleibt nur der Palmitinsäuremethylester nachweisbar. Palmitinsäureäthylester konnte in diesem zweiten Experiment nicht nachgewiesen werden.

In einem dritten Ansatz wurden Triglyceride, die nach dünn-schichtchromatographischer Abtrennung aus der Gesamtblutlipidfraktion gewonnen worden waren, mit Methyljodid in einem gleichen Veresterungsansatz umgesetzt.

Auch in diesem Ansatz werden keine Fettsäuremethylester gefunden. Die Ergebnisse dieser Versuche gehen aus den Abbildungen 16 a und b, 17, 18 hervor.

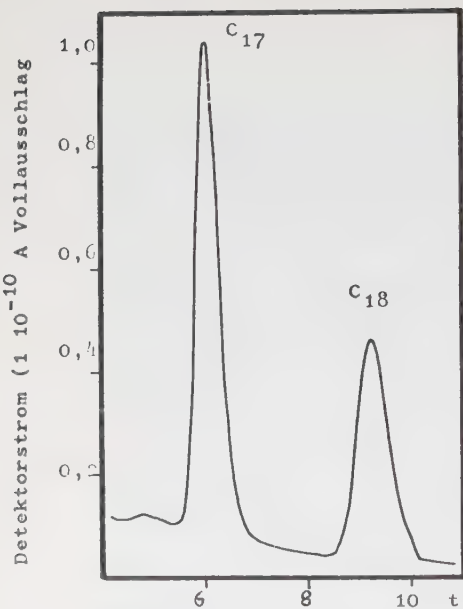


Abb. 14 a: Veresterungszeit 30 min

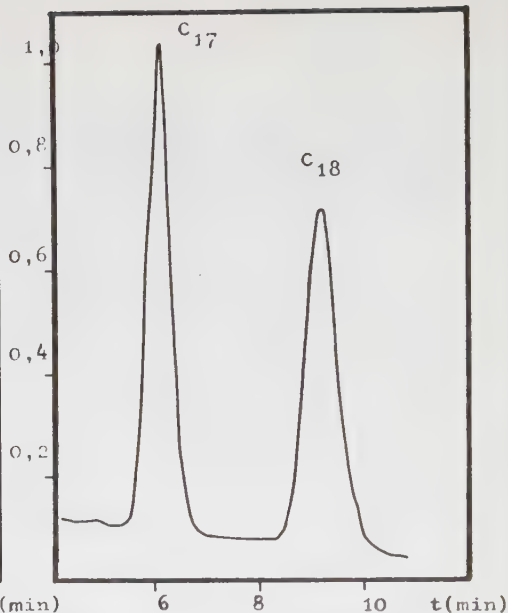


Abb. 14 b: Veresterungszeit 60 min

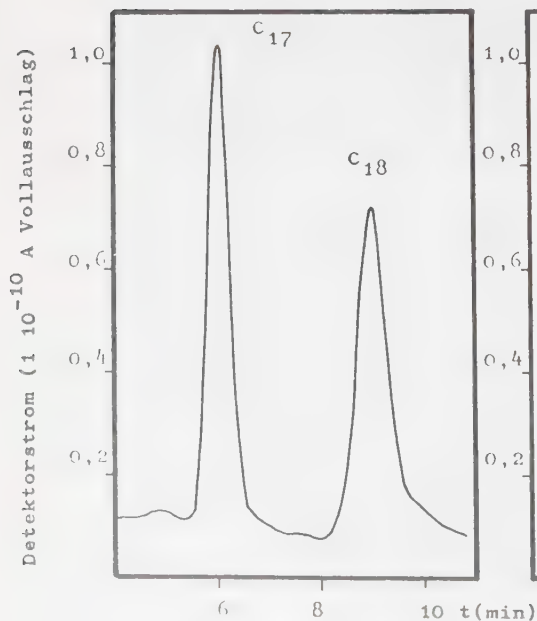


Abb. 14 c: Veresterungszeit 120 min

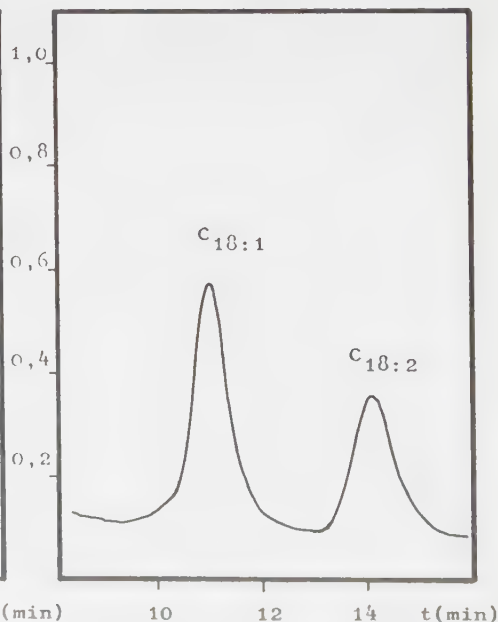


Abb. 15: Veresterungszeit von $C_{18:1}$ und $C_{18:2}$ 120 min
Keine gesätt. Homologen

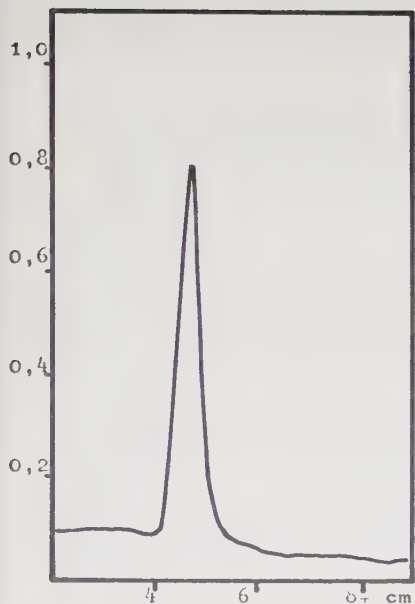


Abb. 16 a: Palmitinsäure-methylester umgesetzt mit Äthyljodid
Versuch einer Umesterung

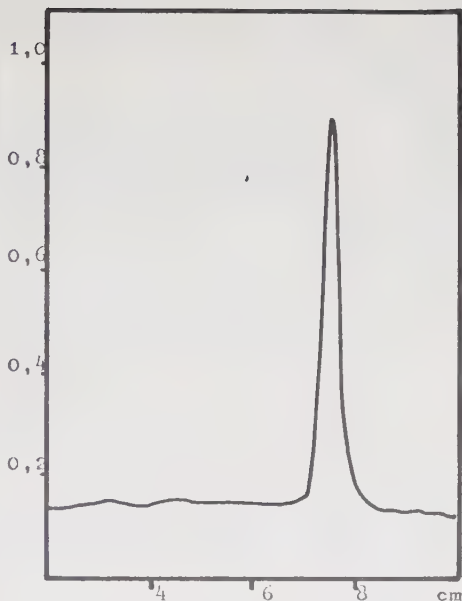


Abb. 16 b: Palmitinsäure-äthylester umgesetzt mit Methyljodid. Versuch einer Umesterung

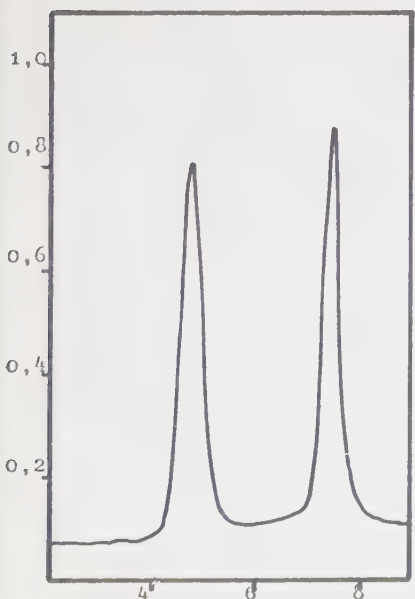


Abb. 17: Methyl- und Äthylester der Palmitinsäure

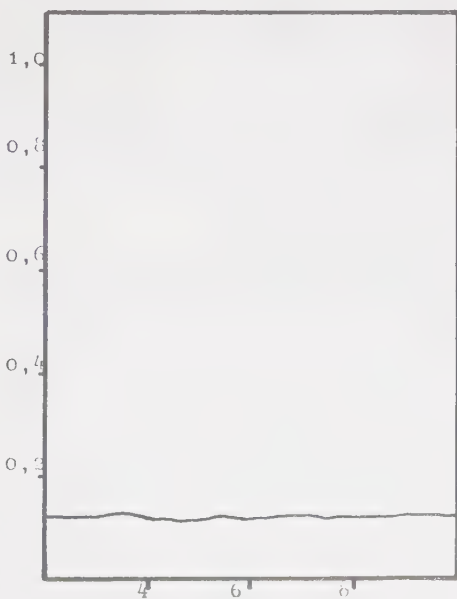


Abb. 18: Dünnschichtchromatographisch abgetrennte Triglyceride umgesetzt mit Methyljodid

5.5. Die isotherme und temperaturprogrammierte gas-chromatographische Trennung der Fettsäurenester

Über das hier vorgestellte Veresterungsverfahren können verschiedene Alkylester der Fettsäuren hergestellt werden. In Vorversuchen, für die ein temperaturprogrammiertes Gerät zur Verfügung stand, wurden die Allyl-Ester an niedrig beschichteten Säulen mit Hilfe einer Temperaturprogrammierung aufgetrennt.

Die folgende Abbildung (Abb. 19) zeigt das Gaschromatogramm von Fettsäure-Allyl-Ester nach temperaturprogrammierter Auftrennung. Der Vorteil dieser Trennmethode liegt einmal im Zeitgewinn. Der Zeitbedarf für die Analyse der Fettsäuren von C_{10} - C_{20} betrug ungefähr 30 min, während für die gleiche Trennung bei isothermem Betrieb ungefähr 80 min benötigt werden. Dieses Temperaturprogramm kann allerdings mit der geforderten Konstanz der Nulllinie nur mit Erfolg bei niedrig beschichteten Säulen mit hochsiedenden flüssigen Phasen durchgeführt werden.

Für die späteren Untersuchungen stand ein temperaturprogrammiertes Gerät nicht mehr zur Verfügung. Es wurde daher die üblicherweise angewandte isotherme Auftrennung durchgeführt. Als Beispiel der isothermen Auftrennung der Fettsäuremethylester von C_{12} - C_{20} sei das Chromatogramm in Abbildung 20 wiedergegeben.

Abb. 19: Gas-Chromatogramm von Fettsäuren-Allylethern

Gerät: PERKIN-ELMER 900

Säule: Glas, 40 cm, $\phi_1 = 2$ mm, 3 % OV-225 auf Chromosorb WHP, 120 - 140 mesh

H₂ (25 ml/min), Luft (250 ml/min), N₂ (30 ml/min)

Detektor: FID

Temperaturprogramm: 40 - 220 °C, 5 °C/min C₁₀

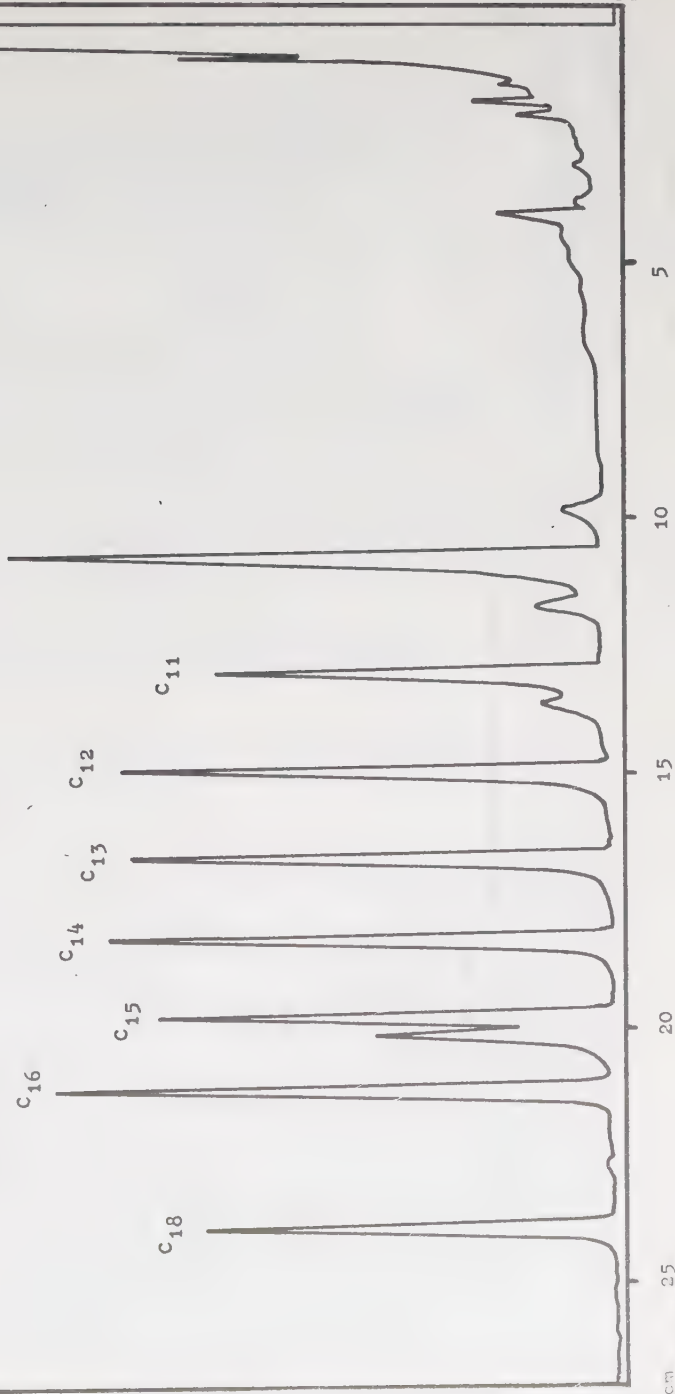
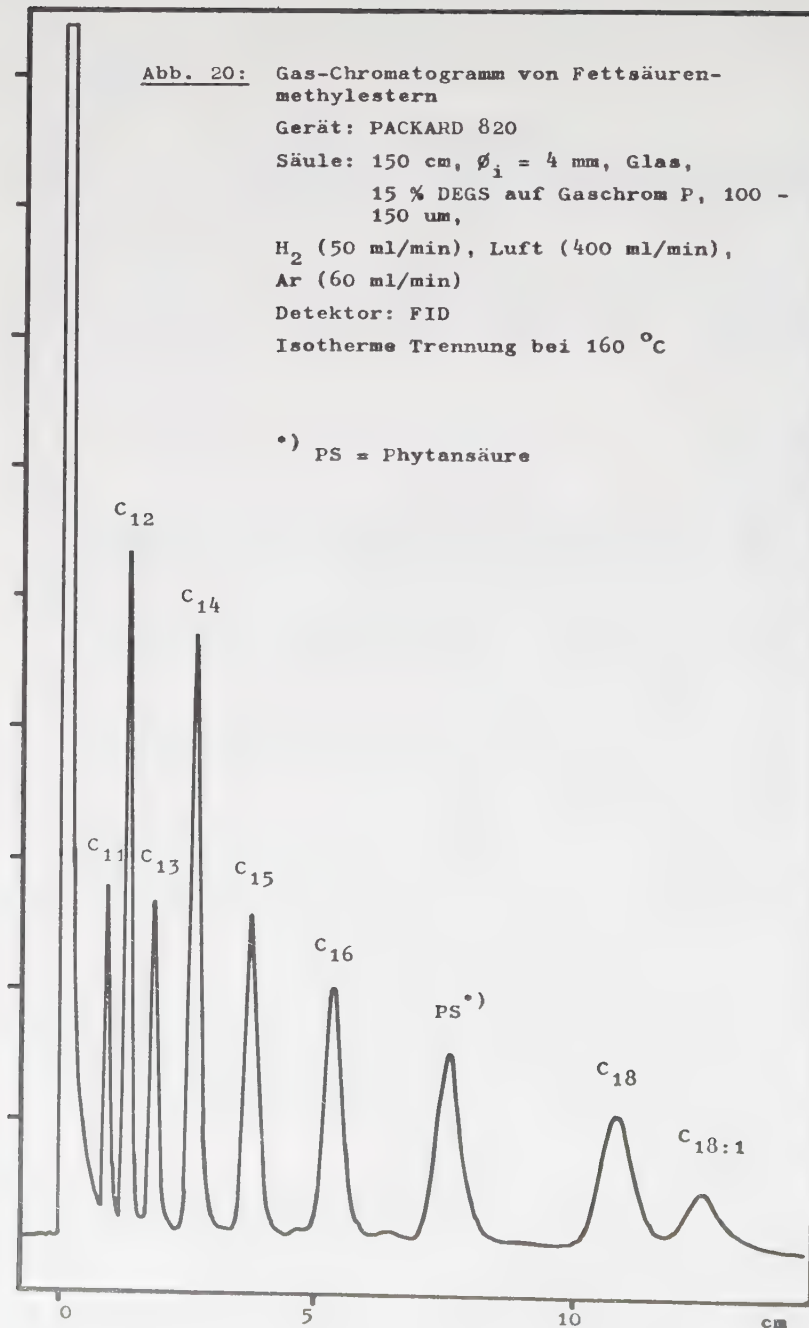


Abb. 20: Gas-Chromatogramm von Fettsäuren-methylestern
 Gerät: PACKARD 820
 Säule: 150 cm, $\phi_i = 4$ mm, Glas,
 15 % DEGS auf Gaschrom P, 100 - 150 μ m,
 H_2 (50 ml/min), Luft (400 ml/min),
 Ar (60 ml/min)
 Detektor: FID
 Isotherme Trennung bei 160 $^{\circ}$ C

*) PS = Phytansäure

Detektorstrom ($1 \cdot 10^{-10}$ A bei Vollausschlag)



6. Arbeitsvorschrift für die Bestimmung der
freien Fettsäuren im Blutserum

6.1. Probennahme

Die Blutproben werden am nüchternen Patienten nach mindestens 12 Std. Nahrungskarenz morgens zwischen 8.00 und 9.00 Uhr mit einer Venenpunktion entnommen. Das Blut wird in einem 1 ml Kunststoffröhrchen mit Stopfen aufgefangen. Die Blutproben werden eine Stunde bei 4 °C aufbewahrt. Nach der Koagulation wird das Serum durch Zentrifugation mit 4000 g und 30 min Dauer gewonnen. Das Serum wird mit einer Kunststoffpipette abgehebert und durch Schütteln gut gemischt. Das Serum von einem ml Blut reicht aus, um bequem eine Dreifachbestimmung der Fettsäuren durchzuführen.

6.2. Denaturierung der Proteine und Extraktion
der freien Fettsäuren

In Zentrifugenröhrchen aus Glas mit einem Volumen von 5 ml, mit NS-14,5 Glasschliffstopfen, werden genau 1,2 ml des organischen Lösungsmittelsystems zur Extraktion der Fettsäuren mit Hilfe einer Mikrobürette vorgelegt. Das organische Extraktionsmittel besteht aus Chloroform und Methanol in einem Volumenmischungsverhältnis von 2:1. Diesem organischen Extraktionsgemisch ist als innerer Standard eine genaue Menge von Margarinsäure (C_{17:0}) beigelegt. Über die Herstellung der Standardlösung und die Eichung dieser Lösung werden in Kapitel 7.2. genaue Angaben gemacht. Zum organischen Lösungsmittel werden mit einer Mikropipette jeweils 10 µl einer 1 N-Schwefelsäure zugegeben. Von dem homogenisierten Serum werden jeweils Proben von 50 oder 100 µl auf die organische Lösung aufgeschichtet.

Mit der Hand werden die verschlossenen Extraktionsgefäße vorsichtig umgeschüttelt, wodurch es zu einer Denaturierung des Proteinanteils des Serums kommt.

Mit einem Vibrationsmixer werden die verschlossenen Extraktionsgefäße in schräger Stellung vorsichtig durchgeschüttelt. Danach bleiben die Proben für die Dauer von 30 min bei Zimmertemperatur stehen. Nach 30 min werden die Proben noch einmal vorsichtig mit dem Vibrationsmixer durchgeschüttelt und anschließend mit 3000 g für die Dauer von 30 min zentrifugiert.

6.3. Überführung der extrahierten Fettsäuren in kleine Reaktionsgefäße

Nach dem Zentrifugieren sammelt sich die wäßrige Eiweißschicht über dem organischen Extrakt an. Durch sehr vorsichtiges, leichtes Beklopfen der Extraktionsgefäße wird die zunächst einheitliche Proteinschicht zerrissen, wodurch es möglich wird, mit einer Mikroliterspritze mit Edelstahlkanüle und gasdichtem Teflon-Kolben ohne anhaftende Proteinreste in die untere organische Phase einzutauchen.

Um das Totvolumen der Mikroliterspritze auszuschalten, werden zunächst 200 μ l Chloroform-Methanollösung ohne Referenzsubstanz in die Spritze angesaugt. Nach Entfernung der Luftblase wird der Kolben genau auf die Nullmarke eingestellt. Es werden genau 1000 μ l organischer Lösung aspiriert und in besondere Glasgefäße überführt. ^{Abb. 12b} Die Form der Glasgefäße für die Einengung der organischen Lösung geht aus Abb. 12^b, Seite 54, hervor. Das organische Lösungsmittel wird bei Zimmertemperatur am Rotationsverdampfer im Wasserstrahlvakuum abgezogen.

Die relativ hohen Siedepunkte der freien Fettsäuren (Myristinsäure: 202,4 °C bei 16 Torr, Stearinsäure: 240,0 °C bei 16 Torr) erlauben auf diese Weise eine verlustfreie Einengung der Lösung. Der Trockenrückstand wird im nächsten

Schritt mit 4 x 50 µl Chloroform-Methanol-Lösung von der Gefäßwand gelöst und in kleine Reaktionsgefäße überführt. Die Form der Reaktionsgefäße, in denen schließlich die Derivatisierung der Fettsäuren vorgenommen wird geht aus Abb. 12c hervor.

Beim Überführen der zur Trockne eingedampften Fettsäuren in den 50 µl-Portionen ist streng auf eine konstante, d.h. standardisierte Arbeitsweise zu achten. Nach Einpipettieren der 50 µl-Portion wird mit einer 20 µl-Pipette sorgfältig die Gefäßwand ringsherum abgespült. Nach fünfmaliger Wiederholung wird die Lösung in das Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang mit jeweils 50 µl organischer Lösung wiederholt sich viermal, so daß schließlich ungefähr 200 µl organischer Lösung im Reaktionsgefäß vorliegen. Über ein besonderes Ansatzstück mit einem NS-5 Schliffkern wird der Lösungsinhalt der Reaktionsgefäße ebenfalls bei Zimmertemperatur im Wasserstrahlvakuum zur Trockne gebracht.

6.4. Derivatisierung der Fettsäuren

In die kleinen Reaktionsgefäße, in denen die Fettsäuren im Trockenrückstand enthalten sind, wird jeweils eine Spatel-Spitze (ca. 10 mg) von fein gemahlenem Kaliumcarbonat (K_2CO_3), welches bei 110 °C im Trockenschrank getrocknet wurde, über einen kleinen Kunststofftrichter eingefüllt. Hierbei ist streng darauf zu achten, daß der Glasschliff des Reaktionsgefäßes nicht mit dem Kaliumcarbonatpulver verschmiert wird, da dann später das Reaktionsgefäß mit dem NS-5 Polyäthylenstopfen nicht mehr dicht verschlossen werden kann.

Mit einer Mikropipette werden genau 50 µl organischer Reagenzlösung in das Reaktionsgefäßchen eingebracht. Das Reagens besteht aus einer 50 Vol.-%igen Lösung von Methyljodid in Essigsäureäthylester. Die Reaktionsgefäße werden dann mit Polyäthylenstopfen sorgfältig unter Eindrehen der Stopfen verschlossen. Die Stopfen werden über Stahlfedern an zwei

kleine Häkchen am Reaktionsgefäß befestigt. In einem thermostatisierten Luftbad werden die verschlossenen Reaktionsgefäß 60 min auf 90 C erhitzt. Nach Ablauf der Veresterungszeit werden die Reaktionsgefäß für die gaschromatographische Bestimmung auf Zimmertemperatur abgekühlt.

6.5. Die gaschromatographische Bestimmung

Gerät: Gaschromatograph von Packard Typ 7800

Säulen: Glassäulen, 150 cm lang, innerer Durchmesser 4 mm.

Säulenpackung: Trägermaterial Gas-Chrom P mit einer Körnung von 180 - 250 m. Beschichtung mit 15 % Diäthylen-Glycol-Succinat (DEGS).

Trägergas: Argon (60 ml pro min).

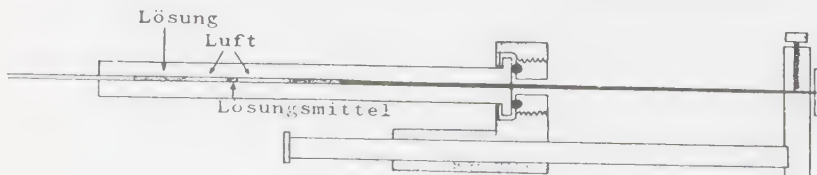
Brenngasgemisch: Wasserstoff (50 ml pro min), Luft (400 ml pro min).

Detektor: Flammenionisationsdetektor FID (Betriebstemperatur: 180 C)

Trennbedingung: isotherme Trennung bei 165 C.

Die Probenlösung wird mit einer 10 Öl Hamilton-Spritze mit einem Probenvolumen von 1-2 Öl auf die Säule aufgebracht. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, ist es unerläßlich, eine besondere Einspritztechnik einzuhalten: Wie in Abb. 21 gezeigt wird, wird die Probelösung in einer besonderen Folge von Luft-Lösungsmittel-Luft-Lösung in die Spritze aufgezogen.

Abb. 21 Mikroliterspritze mit Fhrungshalterung



In Vorversuchen wurde sichergestellt, daß bei den vorliegenden Konzentrationen bei der Auftragung von 1-2 μ l Lösungsvolumen der Detektor linear zur Fettsäurenestermenge anspricht.

Außerdem wurde sichergestellt, daß der Detektor auf alle hier normalerweise vorliegenden Fettsäurenester gleichwertig anspricht.

6.6. Das Gaschromatogramm der Fettsäurenmethylester und seine Auswertung

Für die Auswertung der einzelnen Substanzpeaks des Gaschromatogramms (Abb. 22) sind eine Reihe von Auswertverfahren heute üblich.

Von den in Tabelle 14 zusammengestellten Auswertverfahren einschließlich der elektronischen Integration wurde für die Routinearbeit aus Zeitgründen die dritte Methode zur Auswertung herangezogen. Dabei werden die Peakhöhen mit der berichtigten Retentionszeit (in cm gemessen) multipliziert. Die Summe der Einzelprodukte wird gleich 100 % gesetzt, woraus sich dann der prozentuale Anteil der Einzelkomponenten ausrechnen läßt. Da über die Eichung der Standardlösung das Gewichtsäquivalent der C_{17} -Peakfläche bekannt ist, kann über diese Relation die Konzentration der übrigen Komponenten ausgerechnet werden.

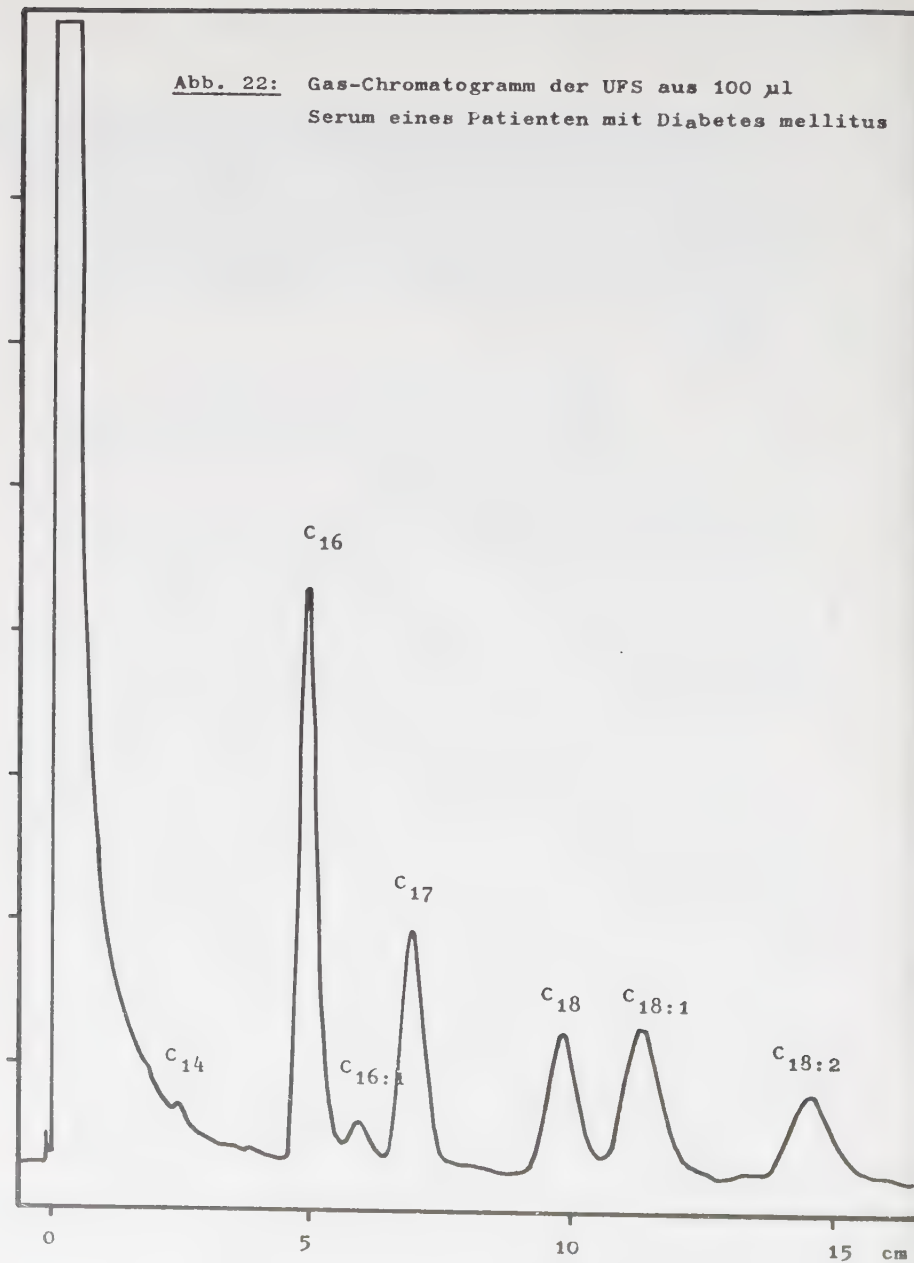
Tabelle 14:

Auswerte-Verfahren:

- 1) Peak-Höhe x Halbwertsbreite
- 2) Peak-Höhe x $1/2$ Basisbreite
- 3) Peak-Höhe x berichtigte Retentionszeit
- 4) Planimetrie
- 5) Wägen der ausgeschnittenen Fläche
- 6) Elektronische Integrationsverfahren

Detektorstrom ($1 \cdot 10^{-10}$ A bei Vollausschlag)

Abb. 22: Gas-Chromatogramm der UFS aus 100 μ l
Serum eines Patienten mit Diabetes mellitus



7. Ergebnisse zur mikroanalytischen Bestimmung
unveresterter Fettsäuren im Blutserum

7.1. Bestimmung der Standardabweichung an
synthetischen Gemischen von Fettsäuren

In der Tabelle 15 sind die Analysenergebnisse synthetischer Lösungen von Fettsäuren zusammengestellt. Von der organischen Lösung der Fettsäuren wurden jeweils 15 Bestimmungen zur Errechnung der Standardabweichung und der Varianz durchgeführt.

Die Varianz ^{*)} für die Gesamtsumme eines grob eingewogenen Gemisches von C_{16} , C_{18} und $C_{18:1}$ bei 15 Bestimmungen beträgt bei einem Mittelwert von 0,973 mmol/l 2,7 %. Die Varianzwerte für die einzelnen Fettsäuren sind in folgender Tabelle (Tab. 15a) zusammengestellt.

7.2. Die quantitative Auswertung der Fettsäure-
analyse mit Hilfe eines inneren Standards

Mit der Einführung eines inneren Standards - wir verwenden als Referenzsubstanz die über Umkristallisation mehrfach gereinigte Margarinsäure mit einem Fp. von $61,2^{\circ}\text{C}$ - kann man nicht nur Unsicherheiten seitens des Gaschromatographen, die durch unkontrollierbare Veränderungen der Betriebsbedingungen eintreten können, vermeiden, sondern hat auf diese Weise eine elegante Möglichkeit, die bei der Extraktion und den Volumenreduktionsschritten möglichen Verluste zu kompensieren; diese Veränderungen und Verluste betreffen dann in gleicher Weise die Referenzsubstanz.

Die Referenzsubstanz wird im Extraktionsmittelsystem gelöst. Es wird eine solche Menge an Referenzsubstanz eingewogen, daß sie der in 1,2 ml vorliegenden Konzentration der extrahierten

^{*)} Unter Varianz wird in diesem Zusammenhang die auf den Mittelwert bezogene relative Standardabweichung in % verstanden.

Tabelle 15

15 Parallelbestimmungen eingewogener Fettsäurenlösungen. Gemessen wurden sowohl Lösungen einzelner Fettsäuren, als auch eine Lösung eines Fettsäurengemisches von C_{16} , C_{18} und $C_{18:1}$, Konzentrationsangaben in $\mu\text{Val/ml}$.

Proben Nr.	C_{16}	C_{18}	$C_{18:1}$	FS- Gemisch
1	0,289	0,144	0,350	0,986
2	0,290	0,141	0,349	0,981
3	0,291	0,136	0,351	0,981
4	0,287	0,136	0,359	0,981
5	0,291	0,140	0,359	0,990
6	0,285	0,146	0,360	0,986
7	0,270	0,138	0,349	0,966
8	0,290	0,131	0,361	0,986
9	0,275	0,130	0,358	0,158
10	0,283	0,143	0,361	0,979
11	0,288	0,141	0,360	0,993
12	0,279	0,130	0,349	0,920
13	0,289	0,132	0,348	0,904
14	0,286	0,139	0,359	0,983
15	0,293	0,142	0,361	1,000
$\bar{x}$	0,286	0,138	0,356	0,973

Tabelle 15a

Mittelwerte der einzelnen Fettsäuren, Standardabweichungen und Varianzen aus 15 Parallelbestimmungen eingewogener Lösungen.

Fettsäure	Mittelwert $\mu\text{Val/ml}$	Standardab- weichung $\mu\text{Val/ml}$	Varianz %
$C_{16:0}$	0,286	0,006	2,3
$C_{18:0}$	0,138	0,005	3,7
$C_{18:1}$	0,356	0,005	1,5
Gemisch	0,973	0,026	2,7

Fettsäuren ungefähr entspricht.

Wir nehmen als durchschnittlichen Normalwert der Fettsäurekonzentration im Serum eine Konzentration von 0,5 mVal/l Serum an. Unter dieser Annahme und dem Einsatz eines Serumprobenvolumens von 100 µl ergibt sich für die Einwaage von Margarinsäure bei der Herstellung von 1 l Extraktionslösung ein Einwaagegewicht von ungefähr 13,5 mg.

Der genaue Gehalt der Extraktionslösung an Referenzsubstanz wird acidimetrisch ermittelt. Ein aliquoter Teil der organischen Lösung der Margarinsäure wird mit 0,02 NaOH mit Nilblau als Indikator titriert.

7.2.1. Einstellung der C₁₇-Standardlösung

4 ml der C₁₇-Extraktionslösung werden mit 2 ml methanolischer Nilblaulösung gemischt und mit einer Mikrobürette mit 0,02 N NaOH titriert.

Verbrauch:

12,5 µl	entsprechend	2 x 0,125 = 0,250 µVal
12,5 µl	"	2 x 0,125 = 0,250 µVal
13,0 µl	"	2 x 0,130 = 0,260 µVal
13,0 µl	"	2 x 0,130 = 0,260 µVal
13,0 µl	"	2 x 0,130 = 0,260 µVal

Vorgelegt waren 4 ml, die also 0,260 µVal Margarinsäure enthalten. D.h. in 1 ml Extraktionslösung sind 0,065 µVal C₁₇ gelöst, was der Normalmenge an unveresterten Fettsäuren in 100 µl Serum entspricht.

Da im vorliegenden Verfahren mit 1,2 ml organischer Lösung extrahiert wird und bei der Abtrennung der organischen Phase zur Vermeidung von Verunreinigungen nur 1,0 ml entnommen werden, muß das Analyseergebnis nach der gaschromatographi-

schen Ermittlung noch mit dem Faktor 1,2 multipliziert werden.

7.3. Die Standardabweichung des Verfahrens bei Serumproben von Normalpersonen mit homogenisiertem Serum

Die folgende Tabelle gibt die Analysenergebnisse von 11 Parallelbestimmungen eines Serums einer Normalperson nach Homogenisierung des Serums dar. Für den Gesamtgehalt des Serums an freien Fettsäuren ergibt sich dabei ein Wert von 0,939 mVal/l mit einer Varianz von 4,8 % (Tab. 16). Die Mittelwerte und Varianzen der Einzelkomponenten sind in Tabelle 17 zusammengestellt.

Tabelle 16:
Standardabweichung- und Varianzberechnung bei 11 Parallelbestimmungen mit homogenisiertem Serum

	Summe der UFS im Serum μVal/ml	Δx · 10^{-3}	$(\Delta x)^2$ · 10^{-6}
	0.914	-25	625
	0.848	-91	8281
	0.915	-24	576
	0.954	15	225
	0.943	4	16
	0.997	58	3364
	1.014	75	5625
	0.935	- 4	16
	0.966	27	729
	0.913	-26	676
	0.930	- 9	81
$\bar{x}$	0.939		20214

$$n = 11$$

$$s = \pm$$

$$s = \pm$$

$$\sqrt{\frac{\sum (x)^2}{n - 1}}$$

$$0,045$$

$$v = 4,8 \%$$

$$\bar{x} = 0.939 \pm 0.045 \mu\text{Val/ml}$$

Tabelle 17:

Mittelwerte einzelner Fettsäuren, ihre Standardabweichungen und Varianzen aus 11 Parallelbestimmungen eines homogenisierten Serums

Fettsäure	Mittelwert μVal/ml	Standardab- weichung μVal/ml	Varianz %
C _{16:0}	0.274	0.016	5,8
C _{18:0}	0.128	0.007	5,5
C _{18:1}	0.343	0.015	4.4
C _{18:2}	0.148	0.008	5.4
Summe			
UFS	0.939	0.045	4.8

7.4. Bestimmung der Standardabweichung von Serum-
proben diabetischer Patienten mit homogenisiertem
Serum

In der folgenden Tabelle 18 sind die Analysenergebnisse von 11 Parallelbestimmungen der freien Fettsäuren im Serum eines diabetischen Patienten zusammengestellt.

Der Mittelwert des Gesamtgehaltes an Fettsäuren beträgt bei diesem Patienten 3,821 mVal/l mit einer Varianz von 5,13 % (Tab. 18).

Tabelle 18:

Standardabweichung- und Varianzberechnung bei
11 Parallelbestimmungen mit homogenisiertem Diabetiker-
serum:

Summe der UFS im Serum /uVal/ml	Δx · 10 ⁻³	$[\Delta x]^2$ · 10 ⁻⁶
4.087	266	70 756
3.684	-137	18 769
3.945	124	15 376
3.544	-277	76 729
3.450	-371	137 641
3.721	-100	10 000
3.912	91	8 281
3.955	134	17 956
3.895	74	5 476
4.015	194	37 636
3.823	2	4
$\bar{x}$ 3.821		398 624

$$n = 11$$

$$s = \pm$$

$$\sqrt{\frac{\sum \Delta x^2}{n - 1}}$$

$$s = \pm 0.0196$$

$$v = 5,13 \%$$

$$\bar{x} = 3.821 \pm 0.019 \text{ /uVal/ml}$$

7.5. Anhang

Normalserum, homogenisiert
Standardabweichung für $C_{16:0}$

Konzentration von $C_{16:0}$ im Serum /uVal/ml	Δx 10^{-3}	$[\Delta x]^2$ 10^{-6}
0.271	- 3	9
0.246	- 28	784
0.257	- 17	289
0.270	- 4	16
0.269	- 5	25
0.285	11	121
0.300	26	676
0.275	1	1
0.296	22	484
0.276	2	4
0.265	- 9	81
$\bar{x} = 0.274$		2490

$$n = 11$$

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum \Delta x^2}{n - 1}}$$

$$s = \pm 0.016$$

$$v = 5,8 \%$$

$$\bar{x} = 0.274 \pm 0.016 \text{ /uVal/ml}$$

Normalserum, homogenisiert
Standardabweichung für C_{18:0}

Konzentration von C _{18:0} im Serum μVal/ml	Δx 10 ⁻³	$[\Delta x]^2$ 10 ⁻⁶
0.117	- 11	121
0.118	- 10	100
0.127	- 1	1
0.134	6	36
0.129	1	1
0.138	10	100
0.138	10	100
0.130	2	4
0.134	6	36
0.121	- 7	49
0.125	- 3	9
$\bar{x} =$ 0.128		557

$$n = 11$$

$$s = \pm$$

$$\sqrt{\frac{\sum \Delta x^2}{n - 1}}$$

$$s = \pm 0.007$$

$$v = 5,5 \%$$

$$\bar{x} = 0.128 \pm 0.007 \text{ μVal/ml}$$

Normalserum, homogenisiert,
Standardabweichung für C_{18:1}

Konzentration von C _{18:1} im Serum μVal/ml	Δx 10 ⁻³	$[\Delta x]^2$ 10 ⁻⁶
0.332	- 11	121
0.313	- 30	900
0.331	- 12	144
0.363	20	400
0.338	- 5	25
0.368	25	625
0.347	4	16
0.351	8	64
0.353	10	100
0.343	0	0
0.337	- 6	36
$\bar{x} = 0.343$		2431

$$n = 11$$

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum \Delta x^2}{n - 1}}$$

$$s = \pm 0.015$$

$$v = 4,4 \%$$

$$\bar{x} = 0.343 \pm 0.015 \text{ } \mu\text{Val/ml}$$

Normalserum, homogenisiert
Standardabweichung für C_{18:2}

Konzentration von C _{18:2} mit Serum µVal/ml	Δx 10 ⁻³	$[\Delta x]^2$ 10 ⁻⁶
0.142	- 6	36
0.135	-13	169
0.151	3	9
0.141	- 7	49
0.140	- 8	64
0.157	9	81
0.167	19	361
0.152	4	16
0.156	8	64
0.143	- 5	25
0.141	- 7	49
$\bar{x} = 0.148$		923

$$n = 11$$

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum \Delta x^2}{n - 1}}$$

$$s = \pm 0.008$$

$$v = 5,4 \%$$

$$\bar{x} = 0.148 \pm 0.008 \text{ µVal/ml}$$

8. Zusammenfassung

1. In einem Überblick über den Fettstoffwechsel, seine Regulationsmechanismen und seine Stellung im Gesamtstoffwechsel, vor allem in bezug auf den Kohlenhydratstoffwechsel, wird gezeigt, daß den im Plasma an Albumin gebundenen, unveresterten Fettsäuren (UFS) eine zentrale Stellung und Bedeutung zukommt.
2. Die bis heute üblichen analytischen Bestimmungsverfahren werden hinsichtlich ihrer Bedeutung und ihres Aussagewertes untersucht und diskutiert.
3. Die besondere Problematik der mikroanalytischen Untersuchung biologischer Proben im Hinblick auf den Zusammenhang von Probenqualität und Interpretation des Analyseergebnisses wird dargestellt.
4. Detaillierte, experimentelle Untersuchungen zur Frage der Anwendbarkeit photometrischer Bestimmungsprinzipien, wie z.B. der Extraktion von Schwermetallseifen in organische Lösungsmittelsysteme und indirekte Bestimmung der UFS-Konzentration über den Metallgehalt im organischen Lösungsmittelsystem werden durchgeführt. Die nicht standardisierbaren Blindwerte und die Instabilität und Störanfälligkeit der organischen Farbkomplexlösungen lassen eine mikroanalytische Anwendung dieses Prinzips nicht für angezeigt erscheinen.
5. Ein neues gaschromatographisches Bestimmungsverfahren zur Bestimmung der im Plasma an Albumin gebundenen UFS wird entwickelt.

6. Ein neues Veresterungsverfahren zur Derivatisierung der Fettsäuren wird für die mikroanalytische Bestimmung entwickelt und hinsichtlich seiner Auswirkung auf das Probenmaterial untersucht.
7. Der Veresterungsmethode liegt ein Verfahren von CLAISEN (125) zugrunde, bei welchem eine Umsetzung der aliphatischen Carbonsäuren mit Alkylhalogenid an K_2CO_3 (als fester Phase) erfolgt. Das Veresterungsverfahren führt nicht zu Umesterungen, so daß eine Abtrennung der UFS von im Extrakt vorliegenden Estern der Neutralfette vor der Derivatisierung nicht notwendig ist. Die Doppelbindungen der ungesättigten Fettsäuren werden durch das Veresterungsverfahren nicht angegriffen. Isomerisierungen und Seitenreaktionen konnten nicht beobachtet werden.
8. Eine genaue Arbeitsvorschrift zur mikroanalytischen Bestimmung der UFS im Blutserum unter Verwendung einer Bezugssubstanz als innerem Standard wird ausgearbeitet und mitgeteilt.
9. Serumproben von Normalpersonen und Personen mit diabetischer Stoffwechsellage werden untersucht.
10. Die Standardabweichung des Verfahrens bei der Bestimmung der UFS im homogenisierten Serum beträgt bei 11 Parallelbestimmungen bei einem Mittelwert von $0,939 \mu\text{Val/ml}$ $\pm 0,045$, was einer Varianz von 4,8 % entspricht.

9. Literatur

1. WERTHEIMER, H.E., SHAPIRO, B.,
The Physiology of adipose tissue
Physiol. Rev. 28, 451-477 (1948)
2. PETTENKOFER, M. von, VOIT, C.,
Untersuchungen über den Stoffverbrauch des normalen
Menschen
Z. Biol. 2, 459-573 (1866)
3. BENEDICT, F.G.,
Study of prolonged fasting
Carnegie Inst. Wash. Publ. 203, (1915)
4. ZUNTZ, N., HAGEMANN, O.,
Stoffwechsel des Pferdes bei Ruhe und Arbeit
Landwirtsch. Jahrb. 2, Suppl. 111 (1898)
5. HOPPE-SEYLER, F.,
Über Seifen als Bestandtheile des Blutplasma und des
Chylus
Z. physiol. Chem. 8, 503-507 (1883/84)
6. SZENT-GYÖRGYI, A. von, TOMINAGA, T.,
Die quantitative Bestimmung der freien Blutfettsäuren
Biochem. Z. 146, 226-238 (1924)
7. DOLE, V.P.,
Energy storage
in: Handbook of Physiology, Section 5, Adipose Tissue
Renold, A.E., Cahill, G.F., eds.
8. REIFENSTEIN, E.C., ALBRIGHT, F., WELLS, S.L.,
The accumulation, interpretation and presentation of
data pertaining to metabolic balances, notably those
of calcium, phosphorus and nitrogen
J. Clin. Endocrinol. 5, 367 (1954)

9. BÄSSLER, K.H.,
Die Bedeutung der Brennstoffzufuhr für die Körperfunktionen.
Z. Ernährungswiss. 11, 200-207 (1972)
10. DOLE, V.P.,
A Relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose
J. Clin. Invest. 35, 150-154 (1956)
11. AYERS, C.W.,
Estimation of the higher fatty acids C₇ - C₁₈
Anal. Chim. Acta 15, 77-83 (1956)
12. IWAYAMA, Y.,
New Colorimetric Determination of higher fatty acids
J. Pharm. Soc. Japan 79, 552-554 (1959)
13. RENOLD, A.E., WINEGRAD, A.J., MARTIN, D.B.,
Diabète sucré et tissu adipeux.
Helv. Med. Acta 24, 322-327 (1957)
14. RODBELL, M.,
Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis.
J. biol. Chem. 239, 375-380 (1964)
15. LINDGREN, F.T., ELLIOT, H.A., GOFMAN, J.W.,
The Ultracentrifugal Characterization and isolation of human Blood Lipids and Lipoproteins, with Applications to the study of Atherosclerosis.
J. Phys. and Colloid Chem. 55, 80-93 (1951)
16. MARKLEY, K.,
Fatty acids, their chemistry and physical properties
New York, Interscience, 1947
17. GOODMAN, D.S.,
The Interaction of Human Serum Albumin with long-chain Fatty Acid Anions.
J. Am. Chem. Soc. 80, 3892-3893 (1958)

18. STEINKE, J.,
A Review of Lipolysis and Diabetes mellitus
in: Fettstoffwechsel 5, Lipolyse und Lipolyseblocker,
Pallas Verlag, Lochham bei München (1969), p. 5-11
19. SENIOR, B., LORIDAN, L.,
Direct regulatory effect of Ketones on lipolysis
and on glucose concentrations in man.
Nature 219, 83-84 (1968)
20. BIALE, Y., GORIN, E., SHAFRIR, E.,
Characterization of tissue lipolytic and esterolytic
activities cleaving full and partial glycerides
Biochim. Biophys. Acta 152, 28-39 (1968)
21. RISACK, M.A.,
Hormone-sensitive lipolytic activity of adipose tissue
in: Handbook of Physiology, Section 5, Adipose Tissue,
Renold, A.E., Cahill, G.F., eds.
Am. Physiol. Soc. 1965, p. 309-311
22. ROBINSON, G.A., BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W.,
Adenyl cyclase as an adrenergic receptor
Ann. New York Acad. Sci. 139, 703 (1967)
23. ROBINSON, G.A., BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W.,
Cyclic AMP
Ann. Rev. Biochem. 37, 149-174 (1968)
24. BUTCHER, R.W., BAIRD, C.E.,
Effects of prostaglandins on adenosine monophosphate
levels in fat and other tissues.
J. biol. Chem. 243, 1713-1717 (1968)
25. BUTCHER, R.W., BAIRD, C.E., SUTHERLAND, E.W.,
Effects of lipolytic and antilipolytic substances
on adenosine monophosphate levels in isolated fat
cells
J. biol. Chem. 243, 1705-1712 (1968)

26. BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W.,
The effects of catecholamines, adrenergic blocking agents, prostaglandin and insulin on cyclic AMP levels in the rat epididymal fat pad in vitro.
Ann. New York Acad. Sci. 139, 849 (1967)
27. DAVIES, J.I.,
In vitro regulation of the lipolysis of adipose tissue
Nature 218, 349-352 (1968)
28. WILLIAMS, R.H., WALSH, S.A., HEPP, D.K., ENSINCK, J.W.,
Method for measuring hormonal effects on conversion of adenosine triphosphate to adenosine 3',5'-monophosphate by isolated lipocytes.
Metabolism 17, 653-668 (1968)
29. SUTHERLAND, E.W.,
The biological role of adenosine 3',5'-monophosphate in: Harvey Lectures, vol. 57,
Academic Press, New York 1961-1962, p. 17
30. BUTCHER, R.W., BAIRD, C.E.,
The Regulation of cyclic AMP and lipolysis in Adipose tissue by Hormones and other Agents.
in: Advances in experimental medicine and biology, vol. 4, Drugs affecting Lipid Metabolism,
Holmes, W.L., Carlson, L.A. Paoletti, R., eds.
Plenum Press, New York, 1969, p. 5-23
31. RUDERMAN, N.B., TOEWS, C.J., SHAFRIR, E.,
The role of free fatty acids in glucose homeostasis
Arch. Int. Med. 123, 299-313 (1969)
32. RANDLE, P.J.,
Carbohydrate metabolism and lipid storage and breakdown in diabetes.
Diabetologia 2, 237-247 (1966)
33. SCRUTTON, M.C., UTTER, M.F.,
The regulation of glycolysis and gluconeogenesis in animal tissues.
Ann. Rev. Biochem. 37, 249-302 (1968)

34. FAIN, J.N., KOVACEV, V.P., SCOW, R.O.,
Antilipolytic effect of insulin in isolated fat
cells of the rat.
Endocrinology 68, 773 (1966)
35. ZIERLER, K.L., RABINOWITZ, D.,
Effect of very small concentrations of insulin on
forearm metabolism. Persistence of its action on
potassium and free fatty acids without its effect on
glucose.
J. Clin. Invest. 43, 950-962 (1964)
36. CRAMER, D.L., BROWN, J.B.,
The component fatty acids of human depot fat
J. Biol. Chem. 151, 427-438 (1943)
37. HIRSCH, J., FARQUHAR, J.W., AHRENS, E.H., PETERSON, M.L.,
STOFFEL, W.,
Studies of Adipose tissue in Man. A microtechnic
for Sampling and Analysis.
Am. J. Clin. Nutrition 8, 499-511 (1960)
38. GORDON, R.S., jr., CHERKES, A.,
Unesterified fatty acids in human blood plasma
J. Clin. Invest. 35, 206-212 (1956)
39. HIRTZ, J.,
Application de la microgravimétrie à l'analyse des
lipides contenus dans des ponctions-biopsies de
foie humain.
Chim. analyt. 51, 434-439 (1969)
40. TÖLG, G.,
Chemische Elementaranalyse mit kleinsten Proben.
Verlag Chemie, Weinheim (1968)
41. STEWART, C.P., WHITE, A.C.,
The determination of soap in blood.
Biochem. J. 232, 1263-1266 (1929)
42. DOLE, V.P., MEINERTZ, H.,
Microdetermination of long-chain fatty acids in
plasma and tissue.
J. biol. Chem. 235, 2595-2599 (1960)

43. GORDON, R.S. jr.,
Interaction between oleate and the lipoproteins
of human serum.
J. Clin. Invest. 34, 477-484 (1955)
44. GORDON, R.S. jr., CHERKES, A., GATES, H.,
Unesterified fatty acid in human blood plasma.
II. The transport function of unesterified fatty acid.
J. Clin. Invest. 36, 810-815 (1957)
45. GORDON, R.S. jr., CHERKES, A.,
Production of unesterified fatty acids from isolated
rat adipose tissue incubated in vitro.
Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 97, 150 (1958)
46. COLEMAN, C.M., MIDDLEBROOK, G.,
Interface enrichment of methylene blue by fatty
acids with microanalytic applications.
Science 126, 163 (1957)
47. MENDELSON, D.,
A colorimetric method for the determination of
microamounts of higher unesterified fatty acids
(C₁₂-C₁₈) in blood.
S. Afr. J. med. Sci. 23, 75-82 (1958)
48. CARLSON, L.A., WADSTRÖM, L.B.,
A colorimetric method of determining unesterified
fatty acids in plasma
Scandinav. J. Clin. and Lab. Investigation 10,
407-414 (1958)
49. KONITZER, K., VOIGT, S., SOLLE, M.,
Eine einfache Methode zur kolorimetrischen Bestimmung
der unveresterten langkettigen Fettsäuren im Plasma
Acta biol. med. German. 12, 502-506 (1964)
50. DUNCOMBE, W.G.,
The colorimetric Determination of long-chain fatty
acids in the 0,05 - 0,5 μ mole Range
Biochem. J. 88, 7-10 (1963)

51. ITAYA, K., UI, M.,
Colorimetric determination of free fatty acids in
biological fluids
J. Lipid Res. 6, 16-20 (1965)
52. NOVAK, M.,
Colorimetric ultramicromethod for the determination
of free fatty acids.
J. Lipid Res. 6, 431-433 (1965)
53. LAURELL, S., TIBBLING, G.,
Colorimetric micro-determination of free fatty acids
in plasma.
Clin. Chim. Acta 16, 57-62 (1967)
54. SCHLESS, G.L.,
Nonesterified fatty acids as metabolic substrate.
The rapid turnover theory.
Metabolism 13, 934-941 (1964)
55. RUDMAN, D., SHANK, P.W.,
Comparison of the responsiveness of perirenal adipose
tissue of the rat, hamster, guinea pig, and rabbit
to the antilipolytic action of insulin.
Endocrinology 79, 565-571 (1966)
56. RUDMAN, D., DI GIROLAMO, M.,
Comparative studies on the physiology of adipose
tissue.
Adv. Lipid Res. 5, 35-117 (1967)
57. RUDMAN, D., DELRIO, A.E.,
Responsiveness to lipolytic hormones and inactivation
of adrenocorticotropin by adipose tissue slices and
free fat cells from different mammalian species.
Endocrinology 85, 209-213 (1969)
58. BERGER, M. PREISS, H., HESSE-WORTMANN, C., GRIES, F.A.,
Altersabhängigkeit der Fettzellgröße und der lipolyti-
schen Aktivität im menschlichen Fettgewebe.
Gerontologie 17, 312-322 (1971)

59. DAVIS, B.D.,
The estimation of small amounts of fatty acid in
the presence of polyoxyethylene sorbitan partical
fatty acid esters ("Tween") and of serum proteins
Arch. Biochem. 15, 351 (1947)
60. TROUT, D.L., EXTES, E.H., FRIEDBERG, S.J.,
Titration of free fatty acids of plasma: a study
of current methods and a new modification.
J. Lipid Res. 1, 199-202 (1959)
61. KENDALL, F.E.,
Studies of human serum proteins: II. Crystallization
of human serum albumin
J. biol. Chem. 138, 97-109 (1941)
62. JAMES, A.T., MARTIN, A.J.P.,
Gas-liquid Partition Chromatography: The Separation
and Micro-estimation of Volatile Fatty acids from
Formic Acid to Dodecanoic Acid.
Biochem. J. 50, 679-690 (1952)
63. GORDON, R.S. jr., CARDON, P., zitiert nach:
Fredrickson, D.S., Gordon, R.S. jr.,
Transport of fatty acids
Physiol. Rev. 38, 585-630 (1958)
64. DALTON, C., KOWALSKI, C.,
Automated colorimetric Determination of free fatty
Acids in Biologie Fluids.
Clin. Chem. 13, 744-751 (1967)
65. HO, R.J., MENG, H.C.,
A simple and ultrasensitive Method for Determination
of free fatty acids by Radiochemical Assay
Anal. Biochem. 31, 426-436 (1969)
66. HO, R.J.,
Radiochemical Assay of long-chain Fatty Acids using
⁶³Ni als Tracer.
Anal. Biochem. 36, 105-113 (1970)

67. HOWORTH, P.J.N., GIBBARD, S., MARKS, V.,
Evaluation of a colorimetric method (Duncombe) of
Determination of Plasma non-esterified fatty acids
Clin. Chim. Acta 14, 69-73 (1966)
68. DUNCOMBE, W.G.,
The colorimetric micro-determination of non-
esterified fatty acids in plasma.
Clin. Chim. Acta 9, 122-125 (1964)
69. WAREMBOURG, H., BISERTE, G., JAILLARD, J., GUIDOLLET-
THEVENOT, J., SEZILLE, G., BERTRAND, M.,
Les acides gras non-estérifiés dans le diabète:
étude comparée des méthodes de dosage titrimétrique
et colorimétrique.
Clin. Chim. Acta 14, 710-713 (1966)
70. PARIJS, J.,
Spécificité du dosage des acides gras nonestérifiés
selon la méthode colorimétrique de Novak.
Clin. Chim. Acta 14, 713-714 (1966)
71. CLAUDE, J.R., ESCHeweGE, E., ROSSELIN, E.G., RICHARD,
J.L., WARNET, J.M.,
Etude sur les acides gras libres plasmatiques dans une
population masculine. Perspectives métaboliques et
physiopathologiques.
Clin. Chim. Acta 32, 229-234 (1971)
72. HAYES, A.N., POZNANSKI, W.J.,
Fluoride-oxalate plasma for colorimetric free fatty
acid measurement.
Clin. Biochem. 3, 315-317 (1970)
73. MIKAC-DEVIĆ, D., STANKOVIĆ, H., BOSKOVIĆ, K.,
A method for determination of free fatty acids in
Serum.
Clin. Chim. Acta 45, 55-59 (1973)
74. ANTONIS, A.,
Semiautomated method for the colorimetric determina-
tion of plasma free fatty acids.
J. Lipid Res. 6, 307-312 (1965)

75. NOVÁK, M., MELICHAR, V., HAHN, P., KOLDOVSKY, O.,
Release of free fatty acids from adipose tissue
obtained from newborn infants.
J. Lipid Res. 6, 91-95 (1965)
76. EGGE, H., MURAWSKI, U., MÜLLER, J., ZILLIKEN, F.,
Mikrolipidanalysen aus Serum mit dem Eppendorf-
system 3000
Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 8, 488-491 (1970)
77. ELPHICK, M.C.,
Modified colorimetric ultramicromethod for estimating
Nefa in serum.
J. clin. Path. 21, 567-570 (1968)
78. NOMA, A., OKABE, H., KITA, M.,
A New Colorimetric micro-determination of free fatty
acids in serum.
Clin. Chim. Acta 43, 317-320 (1973)
79. PINELLI, A.,
A New Colorimetric method for plasma fatty acid
analysis.
Clin. Chim. Acta 44, 385-390 (1973)
80. REGOUW, B.J.M., CORNELISSEN, P.J.H.C., HELDER, R.A.P.,
SPIJKERS, J.B.F., WEEBER, Y.M.M.,
Specific Determination of free fatty acid in plasma
Clin. Chim. Acta 31, 187-195 (1971)
81. SUSIC, D., KOLLING, G.,
Eine halbautomatische Methode für die Bestimmung der
unveresterten Fettsäuren im Serum.
Blut 18, 223-228 (1969)
82. SCHIMMEL, R.J., KNOBIL, E.,
Insulin, free fatty acids, and stimulation of hepatic
gluconeogenesis during fasting
Am. J. Physiol 218, 1540-1547 (1970)
83. PRESTON, S.T. jr., SPRECKELMEYER, S.,
A Guide to the analysis of fatty acids and their
esters by gas chromatography
Poly Science Corp., Evanston Ill., 1971

84. SUPINA, W.R., ROSE, L.P.,
The use of Rohrschneider Constants for Classification
of GLC-Columbus.
J. Chromatogr. Sci. 8, 214-216 (1970)
85. ROHRSCHEIDER, L.,
Eine Methode zur Charakterisierung von gaschromato-
graphischen Trennflüssigkeiten.
J. Chromatogr. 22, 6-22 (1966)
86. ITAYA, K., KADOWAKI, T.,
An improved method for the colorimetric determination
of free fatty acids.
Clin. Chim. Acta 26, 401-404 (1969)
87. MOSINGER, F.,
Photometric adaption of Dole's microdetermination
of free fatty acids.
J. Lipid Res. 6, 157-159 (1965)
88. SUSHEELA, A.K.,
Free fatty acid concentrations in normal and diseased
human muscle and in blood sera from patients with
neuromuscular disease .
Clin. Chim. Acta 22, 219-222 (1968)
89. FOSBROOKE, A.S., TAMIR, I.,
A modified method for the preparation of methyl
esters of a mixture of medium-chain and long-chain
fatty acids. Application to the determination of
serum triglyceride and non-esterified fatty acid
composition and concentration by gas-liquid chromato-
graphy.
Clin. chim. Acta 20, 517-522 (1968)
90. HAGENFELDT, L.,
A gas chromatographic method for the determination
of individual free fatty acids in plasma.
Clin Chim. Acta 13, 266-268 (1966)
91. WAREMBOURG, H., BISERTE, G., SEZILLE, G., JAILLARD, J.,
BERTRAND, M.,
Influence de l'hormone adrénocorticotrope sur la
composition des acides gras non estérifiés de plasma
humain normal.
Clin. Chim. Acta 20, 269-275 (1968)

92. WEENINK, R.O.,
A modified copper reagent for the colorimetric
determination of free fatty acids
Clin. Chim. Acta 24, 186-187 (1969)
93. BOCK, R.,
persönliche Mitteilung
94. BEYER, H.,
Lehrbuch der organischen Chemie
Hirzel, Leipzig, 1962, p. 187 ff.
95. Organikum
Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1964,
p 366 ff.
96. De la COURT, F.H., CASSEL, N.J.P.van, VALK, J.A.M. van
der,
Die Genauigkeit der gaschromatographischen Analyse
von Fettsäuren.
J. Chromatogr. 72, 249-258 (1972)
97. McREYNOLDS, W.O.,
Characterization of some liquid Phases.
J. Chromatogr. Sci. 8, 685-691 (1970)
98. HALLGREN, B., STENHAGEN, S., SVANBORG, A., SVENNERHOHN,
L.,
Gaschromatographic analysis of the fatty acid
composition of the plasma lipids in normal and
diabetic subjects.
J. clin. Invest. 39, 1424-1434 (1960)
99. KINGSBURY, K.J., PAUL, S., CROSSLEY, A., MORGAN, D.M.,
The fatty acid composition of human depot fat.
Biochem. J. 78, 541-550 (1961)
100. STOFFEL, W., CHU, F., AHRENS, E.H. jr.,
Analysis of long-chain fatty acids by gas-liquid
chromatography: micromethod for preparation of methyl
esters
Anal. Chem. 31, 307-308 (1959)

101. STOFFEL, W., INSULL, W. jr., AHRENS, E.H. jr.,
Gas-liquid chromatography of highly unsaturated
fatty acid methyl esters.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 99, 238-241 (1958)
102. FARQUHAR, J.W., INSULL, W. jr., ROSEN, P.,
STOFFEL, W., AHRENS, E.H. jr.,
Analysis of fatty acid mixtures.
Nutrition Reviews 17, Suppl. 8, 1-30 (1959)
103. SCHRADER, W., BÖHLE, E., BIEGLER, R., MEDER, V.,
TEICKE, R.,
Gaschromatographische Untersuchungen der Serumfett-
säuren des Menschen.
I. Mitteilung: Über die Fettsäurezusammensetzung des
Serumfettes beim Gesunden, Arteriosklerotiker und Diabe-
tiker.
Klin. Wochenschr. 38, 126-134 (1960)
104. SCHRADER, W., BÖHLE, E., BIEGLER, R., SABEL, C.,
Gaschromatographische Untersuchungen der Serumfett-
säuren des Menschen.
II. Mitteilung: Beiträge zur Regulation der unver-
esterten Fettsäuren.
Klin. Wochenschr. 38, 707-716 (1960)
105. SCHRADER, W., BÖHLE, E., BIEGLER, R., TEICKE, R.,
ULLRICH, B.,
Gaschromatographische Untersuchungen der Serumfett-
säuren des Menschen.
III. Mitteilung: Die Fettsäuren der Cholesterinester,
Phospholipide und Triglyceride, sowie die unveresterten
Fettsäuren bei Gesunden und bei Arteriosklerotikern.
Klin. Wochenschr. 38, 739-753 (1960)
106. BAKER, G.L.,
Human adipose Tissue Composition and Age.
Am. J. Clin. Nutr. 22, 829-835 (1969)
107. RADIN, N.S., HAJRA, A.K., AKAHORI, Y.,
Preparation of methylesters.
J. Lipid Res. 1, 250-251 (1960)

108. VORBECK, M.L., MATTICK, L.R., LEE, F.A., PEDERSON, C.S.,
Preparation of Methyl Esters of Fatty acids for gas-
liquid chromatography: Quantitative comparison of
Methylation Techniques.
Anal. Chem. 33, 1512-1514 (1961)
109. SCHENK, H., GELLERMAN, J.L.,
Estesification of Fatty acids with diazomethane on
a Small Scale.
Anal. Chem. 32, 1412-1414 (1960)
110. CHAHINE, M.H., COUSINS, E.R., FEUGE, R.O.,
Positional Isomers Formed During the Hydrogenation
of Cottonseed Oil.
J. Am. Oil Chem. Soc. 35, 396-401 (1958)
111. METCALFE, L.D., SCHMITZ, A.A.,
The Rapid Preparation of Fatty Acid Esters for Gas
Chromatographic Analysis.
Anal. Chem. 33, 363-364 (1961)
112. O'CONNOR, R.T., ALLEN, R.R., BROBST, K.M.,
CHIPAULT, J.R., HERB, S.F., HOERR, C.W.,
Report of the Instrumental Techniques Committee
AOCS, 1967-1968,
J. Am. Oil Chem. Soc. 46, 57-59 (1969)
113. GETZ, G.S., BARTLEY, W.,
The intracellular Distribution of fatty Acids in
Rat Liver. The fatty acids of intracellular compartments.
Biochem. J. 78, 307-312 (1961)
114. MÜLLER, E.,
Neuere Anschauungen der organischen Chemie
Springer-Verlag, Berlin, 1957, p. 450
115. LUDDY, F.E., BARFORD, R.A., RIEMENSCHNEIDER, R.W.,
Direct conversion of lipid components to their fatty
acid methyl esters.
J. Am. Oil Chem. Soc. 37, 447-451 (1960)
116. BURCHFIELD, H.P., STORRS, E.E.,
Biochemical Applications of Gas Chromatography
Academic Press, New York, 1962, p. 528

117. RUMSEY, T.S., NOLLER, C.H., BURNS, J.C., KALB, D.,
RHYKERD, C.L., HILL, D.L.,
Gas Chromatographic Resolution of Pyruvic, Lactic,
Glyoxylic, oxalic, Malonic, Fumaric, Malic, Alpha-
Ketoglutaric, and Citric Acids in Forage and Rumen
Fluid.
J. Dairy Sci. 47, 1418-1421 (1964)
118. Mc KEOWN, G.G., READ, S.I.,
Esterification and Gas Chromatography of Some Acids
of the Tricarboxylic Acid Cycle.
Anal. Chem. 37, 1780-1781 (1965)
119. BRECHBÜHLER, H., BÜCHI, H., HATZ, E., SCHREIBER, J.,
ESCHENMOSER, A.,
Die Reaktion von Carbonsäuren mit Acetalen des N,N-
Dimethylformamids: eine Veresterungsmethode.
Helv. Chim. Acta 48, 1746-1771 (1965)
120. MEERWEIN, H., BORNER, P., FUCHS, O., SASSE, H.J.,
SCHRODT, H., SPILLE, J.,
Reaktionen mit Alkylkationen.
Chem. Ber. 89, 2060-2079 (1956)
121. VORBRÜGGEN, H.,
Die Reaktion von Carbonsäuren und Phenolen mit
Amidacetalen.
Angew. Chem. 2, 296-297 (1963)
122. THENOT, J.P., HORNING, E.C., STAFFORD, M., HORNING, M.G.,
Fatty acid esterification with N,N-Dimethylformamide
Dialkyl Acetals for GC Analysis.
Anal. Letters 5, 217-223 (1972)
123. GEHRKE, C.W., GOERLITZ, D.F.,
Quantitative Preparation of Methyl Esters of Fatty
Acids for Gas Chromatography.
Anal. Chem. 35, 76-80 (1963)
124. Mc LAREN, D.S., READ, W.W.C.,
Fatty acid composition of adipose Tissue.
A study in three races in East Africa.
Clin. Sci. 23, 247-250 (1962)

125. CLAISEN, L.,
Bemerkungen zu einer Mitteilung von A. Deninger:
"Über die Darstellung von Benzoesäureanhydrid".
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 27, 3182-3184 (1894)
126. KAWAHARA, F.K.,
Microdetermination of Derivatives of Phenols and
Mercaptans by means of Electron Capture Gas Chromato-
graphy.
Anal. Chem. 40, 1009-1010 (1968)
127. DÜNGES, W.,
persönliche Mitteilung
128. JAMES, A.T.,
Qualitative and quantitative determination of the fatty
acids by gas-liquid chromatography.
In: Methods of Biochemical Analysis, Glick, D., ed.,
Vol. 8,
Interscience, New York, 1960, p. 1-59
129. LOVELOCK, J.E.,
A sensitive detector for gas chromatography
J. Chromatogr. 1, 35-46 (1958)
130. ACKMAN, R.G.,
Gas-Liquid Chromatography of Fatty Acids and Esters
in: Methods in Enzymology
Lowenstein, J.M., ed.
Academic Press, New York, 1969, p. 329-381
131. OLIVECRONA, T.,
The metabolism of 1-¹⁴C-Palmitic Acid in the rat.
Acta physiol. scand. 41, 158-167 (1957)
132. LAURELL, S.,
Turnover Rate of unesterified Fatty Acids in Human Plasma
Acta physiol. scand. 41, 158-167 (1957)
133. FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G.H.S.
A simple method for the isolation and purification of
total Lipides from animal tissues.
J. biol. Chem. 226, 497-509 (1957)

134. LOURY, M.,
Une méthode générale permettant la transformation
rapide des corps Gras en esters méthyliques.
Rev. Fr. Corps Gras 14, 383-389 (1967)
135. CARLSON, L.A.,
Mobilization and Utilization of Lipids after trauma:
Relation to caloric Homeostasis.
In: Porter, R., Knight, J., eds., Energy Metabolism
in trauma.
Churchill, London, 1970, p. 155-171
136. SALIMEN, K., KOIVISTOINEN, P.,
Quantitative Gas Chromatography of Nonvolatile Organic
Acids: Evaluation of the Internal Standard Method.
Acta chem. scand. 21, 1495-1500 (1967)
137. KNAPMAN, C.E.H., HILLMAN, D.E., WALKER, E.A.,
Gas Chromatography Abstracts 1968
Elsevier Publ. Comp., Amsterdam, 1969
138. HORNING, E.C., Van den HENVEL, W.J.A.,
Gas Phase Chromatography. Application to Biochemical
and Biological problems.
Chim. anal. 48, 12-20 und 79-84 (1966)
139. KISHIMOTO, Y., RADIN, N.S.,
Determination of Brain Gangliosides by Determination
of Ganglioside Stearic Acid.
J. Lipid Res. 7, 141-145 (1966)
140. HRADEC, J., MENSIK, P.,
Purification of the Fatty Acid Present in Carcinolipin
J. Chromatogr. 32, 502-510 (1968)
141. WHITE, H.B., POWELL, S.S.,
Isolation and Analysis of Trienoic and tetraenoic
fatty acids with Complementary thin-layer and Gas-
liquid Chromatography.
J. Chromatogr. 32, 451-457 (1968)
142. PELICK, N., SHIGLEY, J.W.,
The fatty acids of Degras.
J. Am. Oil Chem. Soc. 44, 121-125 (1967)

143. QUIN, L.D., HOOBS, M.E.,
Analysis of the Nonvolatile Acids in Cigarette smoke
by Gas Chromatography of their Esters.
Anal. Chem. 30, 1400-1405 (1958)
144. JAMES, A.T., MARTIN, A.J.P.,
Gas-liquid Chromatography: The Separation and Identification of the Methyl Esters of Saturated and Unsaturated Acids from Formic Acid to n-octadecanoic Acid.
Biochem. J. 63, 144-152 (1956)
145. LUKE, H.H., FREEMAN, T.E., KIER, L.B.,
Identification of the Methyl Esters of the Stable Krebs Cycle Acids by Gas Chromatography.
Anal. Chem. 35, 1916-1918 (1963)
146. ROPER, R., MA, T.S.,
Diazomethane as a Reagent for Microsynthesis.
Microchem. J. 1, 245-260 (1957)
147. NOWAKOWSKA, J., MELVIN, E.H., WIEBE, R.,
Separation of the Oxidation Products of fatty acids
by Means of Gas-liquid Partition Chromatography
J. Am. Oil Chem. Soc. 34, 411-414 (1957)
148. CLINTON, R.O., LASKOWSKI, S.C.,
The Preparation of Methyl Esters.
J. Am. Chem. Soc. 70, 3135-3136 (1948)
149. ALCOCK, N.W.,
A simple Procedure for the Extraction and Esterification
of some organic Acid.
Anal. Biochem. 11, 335-341 (1965)
150. GEE, M.,
Methyl Esterification of nonvolatile Plant Acids
for Gas Chromatographic Analysis.
Anal. Chem. 37, 926-928 (1965)
151. TURKINGTON, R.W., TRACY, F.M.,
Spectrophotometric Determination of Ultramicro Amounts
of Copper with 1,5-Diphenylcarbohydrazide.
Anal. Chem. 30, 1699-1701 (1958)

152. SÖLING, H.,

Vortrag auf dem 8. Kongreß der Deutschen Diabetes-
Gesellschaft in München, 21. - 23.6.1973

10. Lebenslauf

Geburt: 27. Februar 1938
Geburtsort: Neuleiningen (Pfalz)
Eltern: Schreinermeister Herman Grünert und
 Ehefrau Elisabeth, geb. Boller

Schulausbildung:

1944-1948 Volksschule Neuleiningen
1948-1954 Progymnasium Grünstadt
1954 Mittlere Reife
1954-1956 Kaufmännische Lehre bei Firma Tonwerk
 Lausen AG., Hettenleidelheim (Pfalz)
1956 Industriekaufmanns-Gehilfenprüfung
1956-1957 Kaufmännische Tätigkeit
1957-1960 Neusprachliches Gymnasium Bad Dürkheim
1960 Abitur

Studium:

SS 1960 - WS 1966/67 Chemiestudium an der Johannes Gutenberg-
 Universität Mainz
WS 1962/63 Diplom-Vorexamen in Chemie
SS 1965 Mündlicher Teil der Diplom-Hauptprüfung
 für Chemiker
SS 1965 - WS 1966 Experimentelle Diplom-Arbeit bei
 Priv. Doz. Dr. G. Tölg am Institut
 für Anorganische Chemie und Kernchemie:
 "Fluoreszenzanalytische Bestimmung von
 Sulfidionen im Nanogrammereich"
SS 1965 - SS 1970 Medizin-Studium an der Johannes Guten-
 berg-Universität Mainz
WS 1966/67 Diplom für Dipl. Chem.

SS 1965	Naturwissenschaftliche Vorprüfung für Mediziner
WS 1966/67	Ärztliche Vorprüfung
WS 1966 - WS 1969/70	Experimentelle Dissertationsarbeit bei Priv. Doz. Dr. G. Tölg am Institut für Anorganische Chemie und Kernchemie: "Zur Elementaranalyse des Schwefels im Nanogramm-Bereich"
Dez. 1969	Promotion zum Dr. rer. nat.
SS 1970	Medizinisches Staatsexamen
ab Sept. 1969	wiss. Assistent m.d.V.b. am Institut für Anorganische Chemie u. Kernchemie
ab Februar 1970	wiss. Assistent, beamtet auf Widerruf, am selben Institut
ab Januar 1972	wiss. Assistent in gleicher Stellung am Institut für Physiologische Chemie, II. Ordinariat, bei Prof. Dr. K.H. Bäßler
Seit August 1972	Assistenzprofessor am selben Institut

Die vorliegende Dissertation entstand in der Zeit von
WS 1970/71 bis SS 1973.

Familie:

26.2.1969	Eheschließung mit der Ärztin Dr. med. Martina Grünert-Fuchs
19.9.1971	Geburt des Sohnes Jan

